

Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone – Signalwege oxidativ modifizierter Lipide

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.),

genehmigt durch

die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl. Biochem. Dagmar Hackel
geb. am 24. August 1977 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Oliver Ullrich
 Prof. Dr. Katharina Braun
 Prof. Dr. Helmut Kettenmann

Eingereicht am: 25. April 2005

Verteidigt am: 3. November 2005

Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist die häufigste chronisch-inflammatorische Autoimmunerkrankung des Nervensystems. Mikrogliazellen und T-Zellen spielen bei dieser Krankheit eine besondere Rolle. Sie können die Degeneration der Nervenzellmembran auslösen und dadurch die Freisetzung von oxidativ modifizierten Produkten bewirken. In letzter Zeit gewannen hierbei vor allem Oxysterole immer mehr an Bedeutung. So konnten signifikant erhöhte Konzentrationen von 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol im Liquor von Patienten, die an MS erkrankt sind, gemessen werden. Dies konnte in der hier vorliegenden Arbeit durch den Nachweis von 7-Ketocholesterol in post-mortem-Gehirnen von MS-Patienten und im ZNS von EAE-Mäusen bestätigt werden. 7-Ketocholesterol bewirkt eine neuronale Schädigung, die durch Mikrogliazellen vermittelt wird und kann von BV-2-Mikrogliazellen sowohl ins Zytosol als auch in den Zellkern aufgenommen und abgebaut werden. Speziell im Zellkern kommt es dabei zu einer durch DNA-Schädigung vermittelten Aktivierung der Poly-(ADP-ribose)-polymerase-1 (PARP-1). Dieser Prozess ist Bestandteil einer weit verzweigten inflammatorischen Signaltransduktionskaskade. 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol bewirken eine Phosphorylierungsaktivierung der MEK1/2 – ERK1/2-, p38- und JNK/SAPK-Signalwege, an deren Ende es wiederum zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB, Elk-1 und NF- κ B kommt. Die verschiedenen Transkriptionsfaktoren sind verantwortlich für eine Genexpression, welche dann die Produktion von Zytokinen und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen bewirkt. So produzieren BV-2-Zellen nach Behandlung mit den genannten Oxysterolen verstärkt TNF- α , IL-6 und NO. Gleichzeitig wird die iNOS-Expression verstärkt und es kommt zu einer Verminderung der IL-10- und MCP-1-Konzentration. Die hochregulierten inflammatorischen Zytokine haben wiederum einen Einfluss auf die einzelnen Signalwege und die PARP-1. Durch die überaus komplexe Interaktion der einzelnen Botenstoffe und Signalkaskaden untereinander entsteht ein weitverzweigter Rückkopplungsmechanismus, welcher in die durch Mikroglia vermittelten neuronalen Schädigung involviert ist und somit von großer Wichtigkeit für die Multiple Sklerose ist.

Schlagwörter:

Multiple Sklerose, EAE, BV-2, Mikroglia, 7-Ketocholesterol, 25-Hydroxycholesterol, PARP-1, TNF- α , IL-6, IL-10, MCP-1, NO, ERK1/2, MEK1/2, p38, JNK/SAPK, Elk-1, CREB, NF- κ B

Abstract

Multiple sclerosis is a chronically, inflammatory, demyelinating autoimmune disease in which T-cells and microglial cells are extensively involved. Recently oxidativ modified breakdown products of the myelin membrane like the oxysterols 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol was detected in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. The present thesis supports these results by finding 7-ketocholesterol in the post mortem brain of MS patients and in the brain stem of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Microglial cells mediate neuronal damage caused by 7-ketocholesterol. Moreover BV-2 microglial cells are capable of accumulate and degrade 7ketocholesterol in the cytosol and in the nucleus. In the nucleus this oxysterol is activating the poly-(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) by damaging DNA. This activation is a part of complex signalling mechanism. 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol effect the phosphorylation of the MEK1/2-ERK1/2, p38 and SAPK/JNK pathway that in turn activate several transcription factors like CREB, Elk-1 or NF κ B. Those factors are responsible for the expression of the genes for cytokines, reactive oxygen and nitrogen species. In BV-2 microglial cells these both oxysterols increase TNF- α , IL-6 and NO together with the iNOS expression and decrease IL-10 and MCP-1. Those products also have an influence on the different signalling pathways and the PARP-1 and so here it is shown a mechanism of a vicious circle of self-sustaining inflammation in neuronal damage mediating microglia.

Keywords:

Multiples Sclerosis, EAE, BV-2, microglia, 7-ketocholesterol, 25-hydroxycholesterol, PARP-1, TNF- α , IL-6, IL-10, MCP-1, NO, ERK1/2, MEK1/2, p38, JNK/SAPK, Elk-1, CREB, NF- κ B

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	
1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	2
1.1.1	Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose	2
1.1.2	Inflammatorischer Verlauf der Multiplen Sklerose	4
1.2	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis – EAE	6
1.3	Die verschiedenen Zelltypen der Immunantwort im ZNS	8
1.3.1	Zellen des Immunsystems, die Einfluss auf die Neuroinflammation haben	8
1.3.2	Residente Zellen des ZNS	10
1.3.3	Inflammatorische Botenstoffe - Zytokine und Chemokine	13
1.4	Mikroglial vermittelte Signalwege	17
1.4.1	Die Bedeutung von mitogen- und stressaktivierten Kinasen bei inflammatorischen Prozessen	17
1.4.2	Rolle von Transkriptionsfaktoren	20
1.4.3	Bedeutung und Funktion der PARP-1 – Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1	21
1.4.4	Die Rolle von Scavenger-Rezeptoren	23
1.5	Neuronen und Oligodendrozytenschädigung durch oxidativen Stress	25
1.5.1	Oligodendrozytenschädigung	25
1.5.2	Neurodegeneration durch oxidativen Stress	26
1.5.3	Cholesterolverstoffwechsel im ZNS	29
1.5.4	Wirkung und Vorkommen von Oxysterolen	31
1.6	Zielstellung	33
2	Material	35
2.1	Chemikalien	35
2.2	Antikörper	37
2.3	Geräte	38

2.4	Material	39
3	Methoden	40
3.1	Zellkultur	40
3.1.1	BV-2-Mikrogliazellen	40
3.1.2	HT22 Neuronen	40
3.1.3	Präparation und Kultivierung organotypischer hippocampaler Schnittkulturen (OHSK)	41
3.1.4	Induktion der exitotoxischen Schädigung mit NMDA und Transfer der Mikrogliazellen auf die Schnittkulturen	42
3.1.5	Präparation primärer Neuronen	42
3.2	Bestimmung der 7-Ketocholesterolkonzentrationen	43
3.2.1	Extraktion der Cholesterole	43
3.2.2	Messung von 7-Ketocholesterol mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	44
3.3	Bestimmung des NO-Gehaltes	44
3.4	Vitalitätsmessungen	45
3.4.1	MTT-Assay	45
3.4.2	Trypanblaufärbung	46
3.4.3	Zelltodbestimmung in den OHSKs mittels Färbung	46
3.5	Proteinbestimmung	48
3.6	Zytokin-Bestimmung mittels ELISA	49
3.7	Zellkernisolation	51
3.8	Zelllyse für MAP-Kinasen	51
3.9	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	52
3.9.1	SDS-Gelelektrophorese	52
3.9.2	Coomassie-Färbung	53
3.9.3	Western Blot	53
3.10	Messung der PARP-1-Aktivität	55

3.11	Induktion und klinische Erhebung von aktiver EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis)	56
3.11.1	Durchführung der EAE	56
3.11.2	Immunohistochemie und Bewertung	56
3.12	Herstellung der Cholesterolverdünnungen	57
3.13	RNA-Midi-Präparation	57
3.14	DNA-Mikroarray	59
3.15	Übersicht über die Durchführung der Experimente	60
3.16	Statistische Auswertung	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Akkumulation und Abbau von 7-Ketocholesterol im Gehirngewebe	65
4.2	Akkumulation von 7-Ketocholesterol im ZNS von Multiple-Sklerose-Patienten und während der EAE in der Maus	75
4.2.1	7-Ketocholesterol im Gehirn von Multiple-Sklerose-Patienten	75
4.2.2	7-Ketocholesterol während der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)	76
4.3	Oxysterolinduzierte Botenstoffe	79
4.3.1	Auswirkung von Oxysterolen auf Zytokine	79
4.3.2	Zusammenhang zwischen Oxysterolen und nitrosativem Stress	81
4.4	Oxysterol induzierte Signalwege	85
4.4.1	MAP-Kinasen in Oxysterol-Signalwegen	85
4.4.2	Aktivierung der PARP-1 durch 7-Ketocholesterol	89
4.4.3	Mikro-Array-Genexpression in 7-Ketocholesterol stimulierten BV-2-Mikrogliazellen	91
5	Diskussion	102
5.1	Einfluss von 7-Ketocholesterol im Gehirngewebe	103
5.1.1	Akkumulation und Abbau von 7-Ketocholesterol durch nichtneuronale Komponenten	104
5.1.2	Rolle neuronaler Komponenten bei der Freisetzung von 7-Ketocholesterol	105

5.1.3	7-Ketocholesterol-bedingte Wechselwirkung zwischen neuronalen und nichtneuronalen Zellen	106
5.1.4	Aufnahme von 7-Ketocholesterol in den Zellkern	107
5.1.5	Oxidative Wirkung von 7-Ketocholesterol	108
5.2	7-Ketocholesterol im ZNS von Multiple-Sklerose-Patienten und EAE-Mäusen	109
5.2.1	7-Ketocholesterol in Gehirnen von Multiple-Sklerose-Patienten	110
5.2.2	Untersuchungen des ZNS von EAE-Mäusen	110
5.3	Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Oxysterole	112
5.3.1	Einfluss von 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol auf Zytokine und Chemokine	112
5.3.2	Auswirkung von Oxysterolen auf das freie Radikal Stickstoffoxid und die induzierbare NO-Synthetase	116
5.3.3	Vitalitätsverlust in Mikrogliazellen durch Oxysterole	118
5.4	Oxysterolinduzierte Signalwege	119
5.4.1	Aktivierung des ERK1/2-, p38- und SAPK/JNK-Signalweges durch Oxysterole	119
5.4.2	Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an der Oxysterol-Signalkaskade	122
5.4.3	Mikrogliale PARP-1-Aktivierung durch 7-Ketocholesterol	123
5.4.4	Veränderte Genexpression durch 7-Ketocholesterol	128
5.5	Ausblick und Schlussfolgerung	131
	Literaturverzeichnis	133
	Danksagung	156
	Lebenslauf	157
	Publikationsliste	158
	Eidesstattliche Erklärung	159

Abkürzungsverzeichnis

BHT	Butylhydroxytoluen
Ca ²⁺	Calcium
CO ₂	Kohlendioxid
EAE	Experimentelle Autoimmune / Allergische Enzephalomyelitis
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extrazellulär Signal regulierte Kinase
FCS	fetales Kälberserum
GSNO	S-Nitrosoglutathion
HDL	High density lipoprotein
HIV	Human immunodeficiency virus
HNE	4-Hydroxynonenal
HO ₂ *	Perhydroxyradikal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HT22	hippokampale Mauszelllinie
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
JNK	c-Jun Amino-terminale Kinases
LDL	Low density lipoprotein
LOO*	Peroxyllipidradikal

MAG	Myelin associated glycoprotein
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogenaktivierte Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogenaktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MBP	Myelin basic protein
MHC	Major histocompatibility complex
MOBP	Myelin associate protein
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MS	Multiple Sklerose
NAD ⁺	Nicotin-Adenin-Dinucleotid
NADPH	β-Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NF-κB	Nucleus Factor κB
eNOS	Endothel NO-Synthetase (NOS III)
iNOS	Immunological, inflammatory oder meistens inducible NO-Synthetase (NOS II)
nNOS	Neuronale NO-Synthetase (NOS I)
NO	Stickstoff(mono)oxid (nitric oxide)
NO ⁺	Nitrosonium
NO ₂ ⁺	Nitronium
NO ₂ [*]	Stickstoffdioxidradikal
¹ O ₂	Singulett Sauerstoff
O [*] ₂	Superoxidanion Superoxid
*OH	Hydroxyl Radikal
OHSK	Organotypische Hippokampale Schnittkulturen
ONOO ⁻	Peroxynitrit

PBS	Phosphat-buffered saline
PLP	Proteolipid protein
PPMS	Primary progressive MS
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPMS	Relapsing progressive MS
RRMS	Relapsing remitting MS
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SOD	Superoxiddismutase
SPMS	Secondary progressive MS
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TNF- β	Tumour Nekrose Faktor- β
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Art und Weise, in der Zellen des Immunsystems den Körper gegen Krankheitserreger und Fremdstoffe verteidigen, kann im Zentralnervensystem (ZNS) für die Funktion und das Überleben von Nervenzellen schädlich sein. Im Falle eines Entzündungsprozesses können Nervenzellen prinzipiell auf direktem und indirektem Wege von den Zellen des Immunsystems attackiert werden. Da Nervenzellen nicht oder nur in geringen Maßen ersetzbar sind, würde eine solche Attacke zu einer starken neuronalen Schädigung mit fatalen Auswirkungen führen (Kölsch et al. 1999). Um dem Angriff von Zellen des Immunsystems zu entgehen, besitzt das ZNS aus diesem Grund ein ganzes Arsenal von Mechanismen, welche der absoluten Kontrolle und Unterdrückung von Immunreaktionen dienen. Man bezeichnet deshalb das ZNS auch als „immunologisch privilegiertes Organ“ (Gebicke-Haerter et al. 1996). Auf der anderen Seite sind aber die Zellen des Immunsystems und eine immunologische Überwachung für Funktionserhalt und Regeneration des ZNS unverzichtbar. Gerät das Immunsystem im ZNS jedoch außer Kontrolle, können entzündliche Schadenskaskaden einen Nervenzelluntergang und ein damit verbundenes neurologisches Krankheitsbild auslösen (Kölsch et al. 1999).

In den letzten Jahren immunologischer Forschung wurde nun erkannt, dass entzündliche Prozesse und Netzwerke wesentlich an der Entstehung und am Voranschreiten vieler neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind, darunter neben der Multiplen Sklerose auch beim Schlaganfall und bei der Alzheimer-Krankheit. Im menschlichen Gehirn bzw. in den entsprechenden Tiermodellen konnten hier Mediatoren wie Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle und reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species – ROS) bzw. reaktive Stickstoffspezies (Reactive Nitrogen Species – RNS) einschließlich NO detektiert werden (Galea et al. 2003). Nach der Aktivierung durch verschiedene interne und externe Stimuli werden verschiedene Zelltypen in inflammatorische Prozesse des Gehirns involviert. Astrozyten und Mikrogliazellen können aktiviert werden und Monozyten und Leukozyten wandern aus der Peripherie ein. Es kommt zur Expression von Zytokinen und anderen Mediatoren der Inflammationen (Gebicke-Haerter et al. 1996, Lockart et al. 1998, Keller et al. 1999). Der durch den Inflamationsprozess bewirkte neuronale Zelltod geht aber auch einher mit einer erhöhten Freisetzung von Cholesterol und deren Umwandlung in seine Metabolite (Kölsch et al. 1999).

In der Untersuchung und Aufklärung molekularer Mechanismen der entzündungsvermittelten Nervenzellschädigung im ZNS liegt ein großes therapeutisches Potential, gerade bei der Behandlung von akutem oder chronischem Nervenzelluntergang, bei denen die eigentliche Ursache entweder noch unbekannt (wie z. B. bei der Alzheimer-Krankheit oder der Multiplen Sklerose) oder

nicht mehr zu verhindern ist (wie z. B. beim Schlaganfall). Hier könnte dann eine gezielte anti-entzündliche Therapie für den Patienten von großem Nutzen sein. Dafür müssen aber zunächst die molekularen Mechanismen bekannt sein, in die dann therapeutisch eingegriffen werden soll. Da den Immunzellen im ZNS aber auch eine wesentliche Funktion bei Regeneration und Reparatur zukommt, ist von einem Eingriff in das Immunsystem des ZNS eine höchstmögliche Genauigkeit zu fordern, um mit der Therapie keinen gegenteiligen Effekt zu erreichen.

1.1 Multiple Sklerose

Als eine inflammatorische, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems, die motorische, sensorische und kognitive Defizite verursacht, ist Multiple Sklerose einer der häufigsten Gründe für Behinderungen mit neurologischem Ursprung bei jungen Menschen (Bruce et al. 1998; Peterson et al.). Mit einer Häufigkeit von 0,05-0,15% ist diese Krankheit bei der kaukasischen Rasse am stärksten vertreten, betrifft Frauen doppelt so stark wie Männer und kommt viel seltener bei Asiaten oder Afrikanern vor (Noseworthy et al. 2000). Zur Zeit sind ungefähr 2 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen (La Flamme et al. 2003). Ihre genaue Krankheitsursache ist zur Zeit noch nicht hinreichend bekannt. Umweltfaktoren wie Pathogene und Chemikalien und ein hohes Auftreten von MS in der nördlichen Hemisphäre erscheinen hierbei von Wichtigkeit und wahrscheinlich spielen sowohl diese als auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Multipler Sklerose (Gilgun-Sherki et al. 2004, Bruce et al. 1998).

Multiple Sklerose entsteht, wenn T-Lymphozyten und andere Zellen des Immunsystems die weiße Substanz des ZNS unterwandern (Tompkins & Miller 2002). Inflammatorische Botenstoffe blockieren die Leitung an den Ranvierschen Schnürringen und lösliche sowie zelluläre Effektoren bewirken den Abbau der Myelinschicht (Bruce et al. 1998). Es kommt dabei zur so genannten Demyelinisierung bzw. Entmarkung. Dies bewirkt eine fortschreitende Paralyse und andere neurologische Symptome wie zum Beispiel Muskelzittern, Taubheit, Juckreiz, Farbenblindheit, Doppelt-Sehen, Blindheit, Verlust der Koordination und des Gleichgewichts, akute Lähmung sowie eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten (Tompkins & Miller 2002).

1.1.1 Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose

Ca. 10 % der Patienten haben entweder einen von Anfang an chronisch verlaufenden Krankheitsprozess (primary progressive MS - PPMS) oder einem primären Schub zu Beginn der Krankheit mit einem anschließenden lebenslangen progressiven Verlauf (relapsing progressive MS – RPMS), während andere einen schnellen akuten Krankheitsverlauf entwickeln, der sich innerhalb

von wenigen Monaten fatal auswirken kann (Peterson et al. 2001, Gilgun-Sherki et al. 2004). Bei der Mehrheit der Patienten – in 80-90 % aller Fälle – zeigt sich die Krankheit jedoch in immer wiederkehrenden Schüben und relativ stabilen neuronalen Funktionen in der Remissions-Phase (relapsing remitting MS - RRMS) (Hemmer et al. 2002, Kremenutzky et al. 1999). Über die Zeit nimmt die Häufigkeit der Schübe zu und meistens entwickeln die Patienten fortschreitende neurologische Behinderungen unabhängig von den einzelnen Schüben (Hemmer et al. 2002). Diese Phase wird auch sekundäre progressive Phase (SPMS) genannt und schließt sich der RRMS-Phase an (Peterson et al. 2001). Der Krankheitsverlauf von Multipler Sklerose kann sehr unterschiedlich sein und sich über einen Zeitraum von 2 Monaten bis 27 Jahren erstrecken (Bruce et al. 1998).

Ein pathologisches Merkmal der Multiplen Sklerose ist die Bildung von so genannten Plaques (Entmarkungsherde). Das sind Stellen der weißen Substanz, die sich durch Inflammation, insbesondere durch Makrophagen und T-Zellen, Demyelinisierung und unterschiedlich starke Schädigung von Axonen charakterisieren (Baranzini et al. 2000). Im Verlauf der Krankheit erfolgt eine Transektion der Axone, deren Häufigkeit in engem Zusammenhang mit dem Grad der Inflammation und der Demyelinisierung innerhalb einer Läsion steht. Eine starke Transektion der Axone erfolgt besonders in aktiven und chronischen Läsionen (Bruce et al. 1998). Die MS-typischen Läsionen sind gewöhnlich in Bereichen der weißen Substanz lokalisiert und charakterisiert durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke, lokale Ödeme und Demyelinisierung (Hemmer et al. 2002).

In einer Phase aktiver Demyelinisierung kommt es zu einem frühen Zeitpunkt der Läsionsbildung zu einer akuten Schädigung der Axone (Kornek et al. 2000). Diese ist nicht nur auf die demyelinisierten Läsionen beschränkt, sondern betrifft auch Regionen in einiger Entfernung von den demyelinisierten Plaques im Bereich der Periplaques und der normalen weißen Substanz (Trapp et al. 1998). Die axonale Schädigung in Plaques mit inaktiver Demyelinisierung ist geringer, was wahrscheinlich im Krankheitsverlauf mit der inaktiven Phase der chronischen Inflammation zusammenhängt. Jedoch sollte bemerkt werden, dass die axonale Zerstörung, auf Grund der zurückbleibenden inflammatorischen Prozesse durch T-Zellen, Makrophagen und aktivierten Mikroglia, trotzdem noch fortschreitet. Auch in remyelinisierten Läsionen konnte noch inflammatorische Aktivität gefunden werden (Kornek et al. 2000). Während der „relapsing-remitting“-Phase der Krankheit kann die Zerstörung der Axone durch Wiederherstellung der Leitung entlang der demyelinisierten Axone, überschüssige Stoffwechselprodukte und axonales Austreiben kompensiert werden (Bruce et al. 1998). Remyelinisierung innerhalb der MS-Plaques scheint die Axone vor weiterer Schädigung zu schützen (Duncan 1996). Die Schädigung der Axone bei Multipler Sklerose kann zu einem dauerhaften neurologischen Schaden führen. Dies korreliert mit einer Atrophie des Cerebellums und des cerebralen Kortex. Mehr als 50 % der Patienten

weisen eine ständig fortschreitende Verschlechterung auf, die nach 10 bis 15 Jahren in einen schubweisen Verlauf übergeht (Bruce et al. 1998). Es kommt über die Zeit zu einer konstanten und progressiv ansteigenden Gehirnatrophie bei Patienten mit MS, was auf die entstehenden axonalen Schäden zurückzuführen ist. Demyelinisierung und Inflammation sind zusätzliche pathologische Zeichen der Multiplen Sklerose und in Konsequenz dazu kommt es zum Verlust von Teilen des Gehirns wie Myelin und glialen Zellen. Dies korreliert mit dem Gewebeverlust im Gehirn von Patienten mit Multipler Sklerose (De Stefano et al. 2003).

1.1.2 Inflammatorischer Verlauf der Multiplen Sklerose

Neurodegenerative Krankheiten, ZNS-Gewebeschäden und Schlaganfall, aber auch infektiöse Krankheiten bewirken Inflammation im ZNS (Allan & Rothwell 2001, del Zappo et al. 2000). Auch bei Multipler Sklerose wird immer wieder die Frage aufgeworfen, ob es sich hier um eine primäre Autoimmunkrankheit gegen Myelin handelt. Aber wie die Inflammation bei vielen infektiösen und degenerativen Erkrankungen des ZNS könnte es sich auch hier um einen sekundären Effekt handeln (Hemmer et al. 2002). Auch wenn genetische Faktoren wie Interleukin-1 β , Interleukin-1 Rezeptor, Immunglobulin Fc-Rezeptor und Apolipoprotein E scheinbar einen wesentlichen Effekt auf die Anfälligkeit für Multiple Sklerose haben, misst man jedoch dem inflammatorischen Mechanismus die größte Bedeutung in Bezug auf Ausbruch und Fortschreiten der Krankheit bei (Gilgun-Sherki et al. 2004). Die Läsionen in Gehirnen von Multiple-Sklerose-Patienten, axonale Pathologie und die Transektion von Axonen korrelieren mit dem Grad der Inflammation (Bjartmar et al. 2000).

Der Verlust von Gewebe im ZNS ist eng verbunden mit der Aktivierung des Immunsystems, was einhergeht mit der Rekrutierung von aktivierten Mikrogliazellen und dem Eindringen von Leukozyten (Hemmer et al. 2002). Unabhängig vom Auslöser der Inflammation sind zwei Stufen nötig, um eine Immunantwort im ZNS auszulösen (**Abbildung 1-1**). Zum einen wird ein proinflammatorisches Milieu benötigt, das zur Hochregulierung des Major-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC), co-stimulatorische Rezeptoren und inflammatorische Zytokine führt, und zum anderen eine Antigen-getriebene Immunantwort. T- und B-Zellen werden im peripheren lymphatischen Gewebe durch Antigene aus dem ZNS oder andere kreuzreaktive Antigene aktiviert (Hemmer et al. 2002). Mögliche Multiple-Sklerose-Antigene können Komponenten des Myelin wie zum Beispiel das Myelin Basic Protein (MBP), das myelinassoziierte Basicprotein (MOBP), das Proteolipidprotein (PLP) und andere sein (Gilgun-Sherki et al. 2004). Dendritische Zellen, die dieses Antigen präsentieren, stimulieren die T-Zell-Antwort. Nach klonaler Vermehrung wandern die T- und B-Zellen in das ZNS ein. Die B-Zellen binden dort wieder ihr spezifisches Antigen und reifen zu

Plasmazellen heran und geben eine große Menge an Immunglobulin- γ (IgG) frei (Hemmer et al. 2002). Dass BZellaktivierung eine wichtige Rolle in der Entstehung von Demyelinisierung spielt, konnte am Menschen und in experimentellen Tiermodellen nachgewiesen werden (Baranzini et al. 2000). ZNS IgGs können Myelin-Lyse über das Ca^{2+} -abhängige Myelinassoziierten Protein (MBP) bewirken, indem diese Antikörper das lösliche oder membrangebundene Antigen auf den präsentierenden Zellen binden (Hemmer et al. 2002, Baranzini et al. 2000).

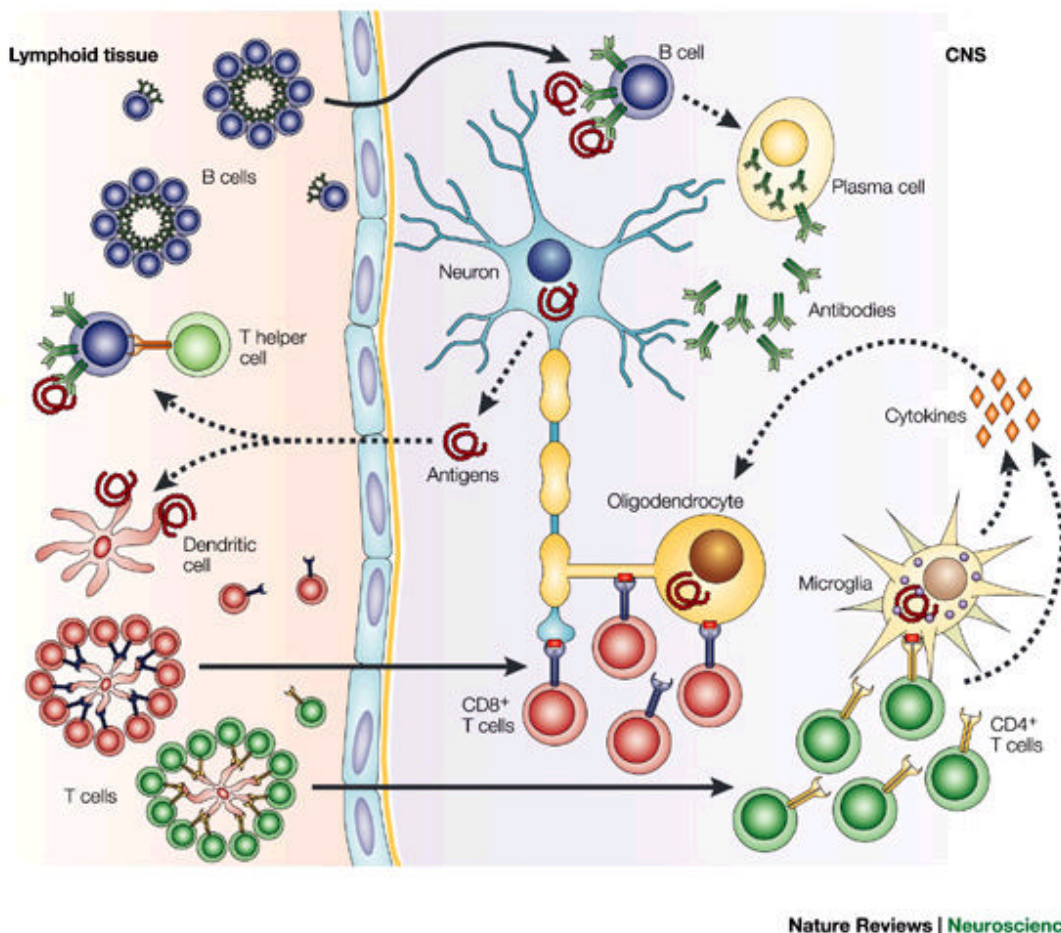


Abb. 1-1 : Immunantwort bei Multipler Sklerose (Hemmer et al. 2002). Hypothetische Ansicht in einer akuten Multiple-Sklerose-Läsion.

CD8^{+} -T-Zellen wandern ebenfalls ins Gehirn und treffen auf ihren entsprechenden Peptid-Liganden, der von Gliazellen oder neuronalen Zellen auf dem MHC-I-Molekül präsentiert wird. Die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes führt zur Schädigung der präsentierenden Zelle. CD4^{+} -T-Zellen wandern ins ZNS und binden ihr entsprechendes Antigen, das auf Mikrogliazellen auf dem MHC-II-Molekül präsentiert wird (Hemmer et al. 2002). CD4 konnte so zum Beispiel deutlich in MS nachgewiesen werden (Baranzini et al. 2000). Die Aktivierung der Mikrogliazellen führt dann zu

einer erhöhten Produktion und Ausschüttung von Zytokinen, welche wiederum andere Zellen anregen. Solche wären zum Beispiel Makrophagen, die weitere schädliche Immunmediatoren freisetzen und die Myelinschicht direkt attackieren (Hemmer et al. 2002).

Jegliche Verletzung des Nervensystems, ob nun durch Infektionen, immunpathologische Vorgänge, Ischämie oder Trauma, ist begleitet von inflammatorischen Prozessen, welche eine schnelle Aktivierung von Gliazellen und eine zusätzliche Einwanderung von Granulozyten, T-Zellen und Monozyten/Makrophagen aus der Peripherie bewirken. Neuroinflammation ist von Ambivalenz geprägt, welche neurologische Schäden hervorruft und an neuropathischen Schmerzen beteiligt ist, aber auch neuroprotektiv und neurotrophisch wirken kann (Franzen et al. 2004).

1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis – EAE

Viele Kenntnisse zur Multiplen Sklerose wurden aus Studien am EAE-Modell, einem Autoimmun-Modell für Multiple Sklerose an Mäusen bzw. Nagern, abgeleitet. EAE ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit spezifisch für Proteinkomponenten des Myelins aus dem ZNS (Drew et al. 2003). Sie endet in einem Prozess, der zu Lähmungen führt und welcher sowohl in klinischer als auch histopathologischer Hinsicht Ähnlichkeit zur MS aufweist (Wekerle et al. 1994). Auch wurden für dieses Tiermodell akute, chronisch wiederkehrende und chronische progressive Krankheitsformen beschrieben (Touhy et al. 1988). Das macht die EAE zu einem nützlichen Modell für Studien, die sich auf Autoimmunkrankheiten bei Menschen beziehen. Es muss jedoch auch gesagt werden, dass viele Therapieansätze, die am Tiermodell erprobt wurden, sich als nur bedingt effizient für den Menschen zeigten (Tompkins & Miller 2002, Zamvil & Steinmann 1990).

Das Modell der EAE wurde vor ca. 70 Jahren entwickelt (Rivers et al. 1933) und ist eine inflammatorische Erkrankung des ZNS mit unterschiedlicher Ausprägung der Demyelinisierung, die durch Myelin-Antigene, welche jeweils spezifisch für das jeweilige Tiermodell sind, ausgelöst wird. Die Krankheit kann bei den meisten Nagetieren und bei einigen Affenarten ausgelöst werden, wobei Krankheitsverlauf und Intensität artspezifisch sind (Hemmer et al. 2002, Martin et al. 1992). Die meisten Kenntnisse über Neuroinflammation stammen aus Experimenten mit EAE. Bizarerweise hat dieses Tiermodell seinen Ursprung in einer Reihe von neuroparalytischen „Unfällen“ beim Menschen aus Tollwutbehandlungen mit abgetöteten Viren aus befallenen Tierhirnen. Die Entdeckung, dass das Gehirnmaterial, welches den Impfstoff kontaminierte, verantwortlich war für die Paralyse, ebnete den Weg für Experimente, bei denen ZNS-Inflammationen und Demyelinisierung in Tieren, die mit Gehirnmaterial immunisiert wurden, induziert werden konnten. Zu Beginn wurde noch Rohmaterial aus dem Rückenmark und Gehirn

verwendet, später nutzte man dann gereinigte Proteine aus dem ZNS (Bradl & Hohlfeld 2003, Raine 1984, Stuart & Krikorian 1928). Nach der Sensibilisierung der Tiere kommt es nach 10 bis 14 Tagen zu einer Reihe von Ereignissen wie starker Gewichtsverlust über Nacht, was zum Herabhängen des Schwanzes, Schlappheit, Paraparese der Hinterläufe und Inkontinenz bis hin zu einem Sterbestadium über 48 Stunden führt (Raine 1984).

Die EAE wird durch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen eine Vielzahl von Myelin-Antigenen und möglicherweise auch Antigene nichtmyelinen Ursprungs ausgelöst (Hisahara et al. 2003). Solche Antigene können MBP (myelin basic protein), PLP (proteolipid protein), MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), MAG (myelin-associated glycoprotein) und das calciumbindende Protein S100 sein (Allegretta et al. 1990, Hohlfeld et al. 1995, Martin et al. 1992). MBP, PLP, MOG und MAG sind Komponenten des Myelin, wobei sich MAG und S100 auf der Oberfläche der Myelinschicht befinden (Hemmer et al. 2002, Hisahara et al. 2003). Durch Myelinantigene oder andere kreuzreaktive Antigene wird im peripheren lymphatischen Gewebe die B- und T-Zellantwort ausgelöst. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wandern durch die Blut-Hirn-Schranke zu ihren spezifischen Liganden (Hisahara et al. 2003). Die dann induzierte EAE wird hauptsächlich vermittelt durch CD4⁺-T-Zellen. Diese treffen auf ihre Antigene, die von Mikroglia und Astrozyten auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. CD4⁺ T-Helferzellen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Th1 und Th2. Th1-Zellen sekretieren inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel Interferon- γ (INF- γ), Tumor Nekrose Faktor- β (TNF- β), Interleukin 2 (IL-2) sowie das proinflammatorische Zytokin TNF- α (Hemmer et al. 2002, Hisahara et al. 2003). Diese Zytokine wirken nun auf andere Immunzellen wie zum Beispiel Makrophagen, welche an der Inflammation beteiligt sind durch Freisetzung von zytotoxischen Zytokinen und direkten phagozytotischen Angriff auf die Myelinschicht (Hisahara et al. 2003). Myelin-spezifische CD8⁺-T-Zellen sind ebenfalls an der EAE beteiligt, jedoch konnte man in diesem Fall die Läsionen nur im Gehirn und nicht auch im Rückenmark nachweisen, wie es bei der CD4⁺-T-Zell-vermittelten Inflammation der Fall ist (Hemmer et al. 2002). CD8⁺-T-Zellen treffen auf ihre spezifischen Liganden, die von Oligodendrozyten und Neurone auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden (Hisahara et al. 2003). Die inflammatorischen Prozesse bewirken Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke, was von Bedeutung ist in Bezug auf das Eindringen von Zellen, Flüssigkeit und Proteinen in das ZNS (Scott et al. 2004). Obwohl T-Zellen die Übertragung der Krankheit vermitteln, sind sie dennoch vom angeborenen Immunsystem des ZNS abhängig. Insbesondere Mikrogliazellen, die das proinflammatorische Milieu vermitteln, sind unabdingbar (Hemmer et al. 2002).

Eine gängige Methode der Induktion der EAE ist eine Immunisierung in SJL/J-Mäusen mit dem synthetischen Peptid aus PLP-Resten (Proteolipid Protein) 139-151, welches dann die EAE auslöst.

Dies führt zur Ausbildung von Th1-Zellen, welche IL-2, INF- γ und TNF- α produzieren (Ruiz et al. 1999). PLP wie auch MBP sind zwei Hauptproteine aus dem Myelin des ZNS und nachweislich enzephalitogen in Hasen, Meerschweinchen, Ratten und Mäusen (Tuohy et al. 1988, Kuchroo et al. 1992). PLP ist hoch hydrophob und hat mehr als eine enzephalitogene Region. (Martin et al. 1992) In MS-Patienten konnten PLP-spezifische T-Zelllinien nachgewiesen werden, weshalb PLP eine Rolle bei Multipler Sklerose zugeschrieben wird (Kuchroo et al. 1992).

Wie bei der MS konnte auch im EAE-Tiermodell axonale Degeneration gezeigt werden (Kornek et al. 2000). Im Gewebe des ZNS von EAE-Tieren konnten Poly(ADP-Ribose)-Reste nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass dieses Enzym an dem Prozess der Krankheit beteiligt ist (Scott et al. 2004). Es gibt Studien, die zeigen, dass sich nach Auftreten der ersten klinischen Symptome die Konzentration von Cholesterol LDL und HDL (Low und high density lipoprotein) erhöht (Shore et al. 1987).

1.3 Die verschiedenen Zelltypen der Immunantwort im ZNS

Multiple Sklerose (MS) und das entsprechende Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) sind, wie schon gezeigt, inflammatorische Krankheiten des zentralen Nervensystems, charakterisiert durch lokale Bereiche der Entmarkung (Hisahara et al. 2003). An der Immunantwort im ZNS während der MS (1.1) und der EAE (1.2) sind verschiedene Zelltypen beteiligt. Auf der einen Seite hat man hier die Zellen des Immunsystems, zu denen Makrophagen, Mastzellen, T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen gezählt werden. Dem gegenüber stehen die residenten Zellen des ZNS wie Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten (Chavarria und Alcocer-Varela 2004).

1.3.1 Zellen des Immunsystems, die Einfluss auf die Neuroinflammation haben

1.3.1.1 T- und B-Lymphozyten

Entzündungen im ZNS sind einzigartig, da dem Gehirn sein eigenes lymphatisches Gewebe und dendritische Zellen fehlen. Nur im Falle der immunologischen Überlebensstrategie ist ein limitierter Lymphozytentransport durch die Bluthirnschranke möglich (Hickey 2001). Schon frühzeitig konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten eine fundamentale Rolle bei der Entwicklung der EAE spielen (Paterson 1960). Die Einwanderung von Zellen in das ZNS erfolgt in zwei Phasen, wobei in der ersten Phase fast nur Lymphozyten eine Rolle spielen. In der zweiten Phase kommt es zu einer

Störung der Bluthirnschranke und nachfolgend auch zu einem Eindringen weiterer Zelltypen (Hickey 1999).

T-Zellen oder auch T-Lymphozyten erkennen ihr spezielles Antigen und lösen einen inflammatorischen Prozess aus, was dann die Produktion von entsprechenden Zytokinen nach sich zieht. Das wiederum aktiviert und/oder schädigt das Endothelium der Bluthirnschranke und erlaubt so das Passieren anderer Zellen (Chavarria und Alcocer-Varela 2004). Abhängig von den Zytokinen und Chemokinen, welche die T-Zellen produzieren, werden sie in Th1- (IFN- γ , IL-2, LT, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β) und Th2-Zellen (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) differenziert. Myelin-reaktive T-Zellen sekretieren beide Sorten von Zytokinen aus Th1- und Th2-Zellen (O'Conner et al. 2001, Karpus und Ransohoff 1998).

Auch B-Zellen bzw. B-Lymphozyten spielen eine Rolle während der MS und EAE. Welche Aufgabe sie genau haben, ist nicht ganz klar. In jedem Fall wurden sie im Liquor von MS-Patienten (Qin et al. 1998) und in aktiven Läsionen während des Prozesses der Demyelinisierung gefunden (Williamson et al. 2001). Es wird diskutiert, dass B-Zellen keine Rolle bei der Expression dieser Krankheit spielen, sondern nur eine Bedeutung während der Erholungsphase haben (Genain et al. 1999, Wolf et al. 1996). Andererseits wurde aber auch gezeigt, dass sie während der gesamten Krankheitsentwicklung Einfluss haben und ihnen eine ähnliche Bedeutung wie den T-Zellen zugeschrieben wird (O'Conner et al. 2001, Hickey 1999, Willenborg und Prowse 1983).

1.3.1.2 Mastzellen

Im ZNS von MS-Patienten und EAE-Tieren wurde ebenfalls die Präsenz von Mast-Zellen beschrieben (Chavarria und Alcocer-Varela 2004). Mast-Zellen sind multifunktionelle Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, welche gleichmäßig über die Gewebe verteilt sind. Im Gehirn sind sie nicht so zahlreich vertreten und ihre genaue Rolle bleibt spekulativ. Im Falle der MS misst man den Mast-Zellen eine Rolle während der Pathophysiologie der Krankheit bei (Zappulla et al. 2002). Mast-Zellen sind eine wichtige Quelle von Histaminen, Leukotrienen, Prostaglandinen, TNF- α und anderen Molekülen und haben eine Wirkung auf das vaskuläre Endothelium der Blut-Hirn-Schranke. Auf diese Weise tragen sie bei zur Störung der Permeabilität und dem darauf folgenden Eindringen von Leukozyten – T- , B-Zellen, Killerzellen, Makrophagen und Monozyten (Benoist und Mathis 2002).

1.3.1.3 Natürliche Killerzellen

Auch natürliche Killerzellen werden zum angeborenen Immunsystem gezählt. Sie sind in der Lage kanzerogene oder viral befallene Zellen, mittels zytosuidaler Wirkung oder Induktion von

Apoptose, zu eliminieren (Schmidt et al. 2004). Die Rolle von natürlichen Killerzellen während der Inflammation im ZNS ist kontrovers. Nur wenig ist bekannt über ihre Rekrutierung und ihr Schicksal im gesunden ZNS und während der Entstehung von Entzündungen. Es steht jedoch außer Frage, dass sie an Inflammationen beteiligt sind (Hickey 1999). Diese Zellen reagieren auf Zytokine, die von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen ausgeschüttet werden, erhöhen deren Produktion von IFN- γ und fördern so das Th1-Profil während der EAE (Chavarria und Alcocer-Varela 2004).

1.3.1.4 Dendritische Zellen

Eine Inflammation im ZNS ist begleitet von einem Heranziehen und der Entwicklung von dendritischen Zellen in den betroffenen Gehirnregionen. Dendritische Zellen sind eine Unterklasse von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die an der Initiierung und Regulation der adaptiven Immunität gegen Pathogene und Tumoren als auch bei der Auslösung von Autoimmunität beteiligt sind (Pashenkov et al. 2003). Sie können autoreaktive T-Zellen mit Th1-Profil in lymphatischen Nodien und im ZNS aktivieren. Ihre Wirkung ist jedoch nicht nur auf die T-Zellen begrenzt, auch wenn dies ihre Schlüsselrolle zu sein scheint (Banchereau et al. 2000, Chavarria und Alcocer-Varela 2004). Dendritische Zellen im Liquor und vermutlich auch in MS-Läsionen repräsentieren einen Faktor, der vermutlich eng im Zusammenhang mit dem chronischen Verlauf von Multipler Sklerose steht (Pashenkov et al. 2003).

1.3.1.5 Monozyten – Makrophagen

Die Gruppe der Makrophagen/Monozyten ist sehr komplex. Verschiedene Zelltypen des ZNS werden zu dieser Gruppe gezählt. Hierin werden Mikrogliazellen, perivaskuläre (mikrogliale/makrophagen) Zellen, meningeale Makrophagen, Makrophagen des Choroid Plexus, Epilexus-Zellen und die standard-phagozytierenden Makrophagenzellen eingeordnet. Alle diese Zellen werden unterschieden nach ihrer Lokalisierung, Morphologie, Funktion und Molekülen, die an ihrer Oberfläche exprimiert werden (Hickey 1999). Bei Multipler Sklerose spielen Makrophagen eine bedeutende Rolle. Zusammen mit den Lymphozyten dringen sie in die weiße Substanz ein und zerstören dort das Myelin und die freigelegten Axone. Auch bei Inflammationen und der Immunantwort im ZNS und der Demyelinisierung während der MS wird den Makrophagen Bedeutung beigemessen (Minagar et al. 2002) (→ 1.3.2.4. Mikroglia).

1.3.2 Residente Zellen des ZNS

Nicht nur Zellen des Immunsystems nehmen aktiv an der Inflammation teil, sondern auch Zellen

des ZNS spielen eine fundamentale Rolle in diesem Prozess. So wurde gezeigt, dass Neuronen, Astrozyten und Mikroglia auch in der Lage sind, ein breites Spektrum immunologischer und inflammatorischer Moleküle zu produzieren, einschließlich der entsprechenden Zytokine, Chemokine und entsprechender Rezeptoren, Komplementmoleküle und anderer (Chavarria und Alcocer-Varela 2004, McGeer und McGeer 2001).

1.3.2.1 *Neuronen*

Neuronen spielen während des inflammatorischen Prozesses eine weniger große Rolle. Sie haben jedoch auch die Möglichkeit, MHC I Moleküle zu exprimieren und produzieren verschiedene Zytokine wie zum Beispiel IFN- γ (Olsson et al. 1994) und können auch in T-Zellen Apoptose induzieren (Flügel et al. 2000).

1.3.2.2 *Oligodendrozyten*

Oligodendrozyten sind Zellen, in denen durch Wachstumsfaktoren und bestimmte Zellsignale Entwicklung und Regeneration angeregt werden. Im reifen Stadium erscheinen sie in einem molekularen Ruhestadium und sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Myelinschicht (Raine 1997). Man geht davon aus, dass die Entmarkung während der MS durch die Zerstörung der Oligodendrozyten geschieht (Brück et al. 2003). Obwohl diese Zellen fast keine Zytokine ausschütten, Ausnahme sind geringe Mengen an IL-18, exprimieren sie auf ihrer Zelloberfläche Zytokinrezeptoren, insbesondere solche für Th2-Typ-Zytokine (Cannella et al. 2003). Oligodendrozyten sind jedoch noch weniger effektiv in der Präsentation von Antigenen als Astrozyten und dienen so eher als Ziel des inflammatorischen Prozesses (**Abbildung 1-1**) (Neumann 2001).

1.3.2.3 *Astrozyten*

Es ist bekannt, dass Astrozyten als Antigen-präsentierende Zelle fungieren können. Wenn auch nicht in dem Maße wie Mikroglia und perivaskuläre Makrophagen, sind sie in der Lage, die entsprechenden Co-Rezeptor-Moleküle zu exprimieren, wie zum Beispiel MHC I und II, B7-1 oder LFA-3 (Piehl und Lidman 2001). Astrozyten waren die ersten Zellen, auf denen man die Prozessierung und Präsentation von Myelin-Antigen für T-Zellen nachweisen konnte (Fontana et al. 1984). Sie haben eine Wirkung als Effektor auf T-Lymphozyten. Ihnen fehlt jedoch die Möglichkeit zur Expression von entsprechenden costimulatorischen Molekülen. Zwar induzieren sie die Expression von MHC I und II, sind aber nicht in der Lage, das volle Aktivierungsprogramm für naive T-Lymphozyten auszulösen (Neumann 2001).

1.3.2.4 Mikroglia

Die schon beschriebenen Astrozyten und Oligodendrozyten gehören zur Gruppe der Makroglia. Daneben gibt es noch eine zweite Hauptgruppe von Gliazellen die Mikroglia (Benevise 1997). Mikroglia sind die residenten Makrophagen des ZNS und werden als der Zelltyp angesehen, der am effizientesten Antigene präsentieren kann. Die Empfindlichkeit von Mikrogliazellen gegenüber kleinster Veränderung in ihrer Umgebung befähigt sie zu einer Art Wächterposition (Kreuzberg 1996). Man unterscheidet drei Hauptstadien von Mikrogliazellen: zum einem die ruhenden, ramifizierten Mikroglia, wie sie im normalen ausgereiften ZNS vorkommen, dann die aktivierten, nicht phagozytotischen Mikroglia, wie sie in Bereichen der ZNS Inflammation vorkommen und schließlich die reaktiven, phagozytierenden Mikroglia, die bei Trauma und Infektionen auftreten (Minagar et al. 2002). Eine Vielzahl von Oberflächenmarkern sind für Mikroglia beschrieben. Dazu gehören MHC-Klasse-I- und -II-Antigene, Fc-Rezeptoren (I-III), Komplementrezeptoren (CR1, CR2, Cr4), β_2 -Integrine, intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) und costimulatorische Moleküle wie B7-1 und B7-2 (Benevise 1997).

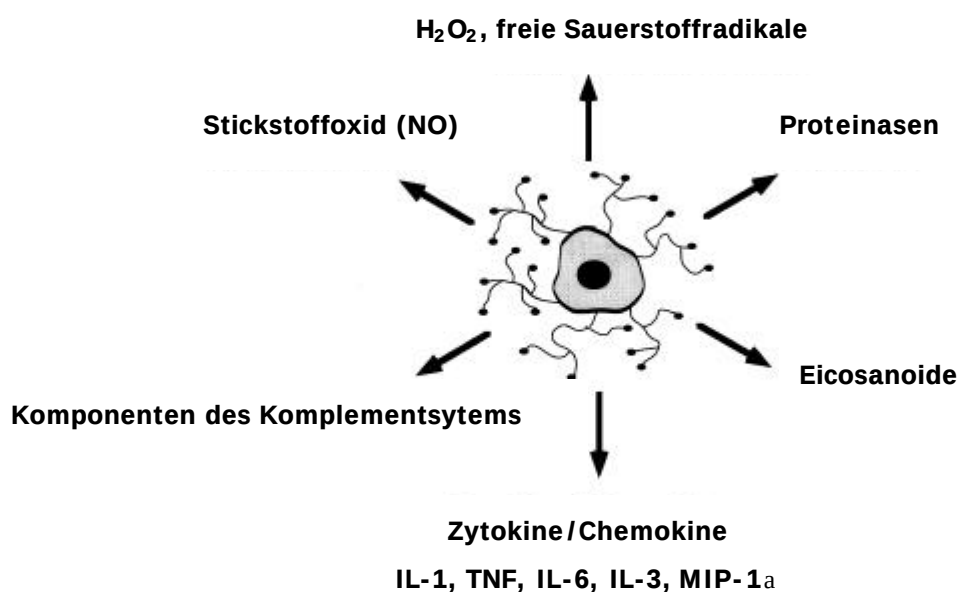


Abb. 1-2: Mikrogliale Mediatoren der ZNS Inflammation und Schädigung.

In verschiedenen neurologischen Krankheiten (einschließlich HIV/ADIS, Alzheimer und MS) treiben Mikroglia den pathologischen Kreislauf von Zellrekrutierung, Aktivierung und die Sekretion verschiedener Botenstoffe und Antigenpräsentation an (Nelson et al. 2002). Ihre Funktion ähnelt der von normalen Gewebemakrophagen und reicht von Phagozytose, Antigenpräsentation bis hin zur Produktion von Zytokinen, Eicosanoiden, Komponenten des Komplementsystems, exitatorische

Aminosäuren (Glutamat), Proteinasen, Sauerstoffradikale und Stickstoffoxid (**Abbildung 1-2**) (Banati et al. 1993, Gordon 1995, Gehrman et al. 1995, Minagar et al. 2002).

Das Wissen über die Regulation von Mikroglia und insbesondere über die Expression von MHC-Molekülen sowie costimulatorischen Faktoren, wie Zytokine oder Chemokine, ist entscheidend für das Verständnis um die während der Schädigung des ZNS-Gewebes auftretende Inflammation (Neumann 2001). Mikroglia kontrollieren den Zustand ihrer Umgebung und können auf Zeichen, die auf eine Störung der Homeostase hinweisen, mit unterstützenden und schützenden Mechanismen reagieren und sind somit an spezifischen Immunreaktionen beteiligt (Carson 2002, Kreuzberg 1996). Hierfür benötigen sie ein bestimmtes Profil wie zum Beispiel Rezeptoren und Ionenkanäle, durch welche sie Erscheinung, ungewöhnliche Konzentrationen oder veränderte Formen von löslichen und unlöslichen Faktoren detektieren und so Schäden und Gefahr registrieren. Dafür stehen ihnen eine Vielzahl von Messengern zur Verfügung. Die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Geweben basiert auf dem Austausch von Zytokinen und Chemokinen, welche auf viele Zelltypen wirken (Hanisch 1996). Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf mikrogliale Signalwege und Signalmoleküle gerichtet sein.

1.3.3 Inflammatorische Botenstoffe - Zytokine und Chemokine

Während des Verlaufs von Multipler Sklerose und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis wird ein breites Spektrum von Zytokinen ausgeschüttet. Dazu zählt man Interleukine (IL), TNF (Tumor Nekrose Faktor), Lymphotoxin (LT), Interferon (IFN), Wachstumsfaktoren und Chemokine (**Abbildung 1-3**). Aktivierte Mikroglia präsentieren das Fremd-Antigen in Konjugation mit Klasse-II-MHC-Molekülen den $CD4^{+}$ -T-Helferzellen. Diese werden aktiviert und sekretieren Zytokine wie $IFN-\gamma$, welche wiederum eine weitere Aktivierung der Mikroglia bewirken. Das von ihnen dann produzierte $TNF-\alpha$ und Stickstoffoxid (NO) kann zu Oligodendrozytenschädigung führen, was eine Interferenz zwischen Myelinisierung und Myelinenexpression bewirkt. Astrozyten und Mikroglia kommunizieren ebenfalls miteinander über lösliche Mediatoren wie Zytokine. So können mikrogliale Zytokine wie IL-1, IL-6 und $TNF-\alpha$ Astrogliosis und die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf Astrozyten induzieren. Diese wiederum produzieren Wachstumsfaktoren, welche wichtig sind für die Aufrechterhaltung des Wachstums der Mikroglia (Benevise 1997, Minagar et al. 2002).

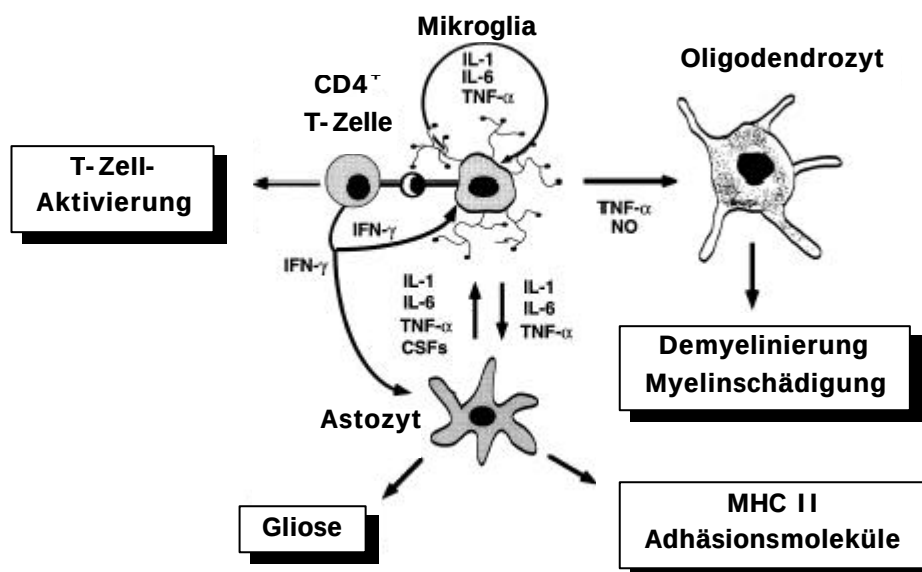


Abb. 1-3: Potenzielle Wechselwirkung zwischen Mikrogliya und T-Zellen, Astrozyten und Oligodendrozyten.

1.3.3.1 Bedeutung von MS-relevanten Zytokinen

Im Kontext der immunvermittelten Hirnschädigung werden insbesondere Mikrogliya als Haupteffektorzellen des ZNS betrachtet. Einmal aktiviert können sie eine große Anzahl verschiedener Zytokine exprimieren (Benevise 1997). Hierbei handelt es sich um multifunktionale Proteine, welche als humorale Regulatoren im nano- bis picomolaren Bereich wirken und unter normalen, pathologischen und toxischen Bedingungen die Funktion von verschiedenen Zellen und Geweben modulieren (Viviani et al. 2004).

Als einer der Hauptregulatoren für die angeborene und adaptive Immunantwort dienen Zytokine der zellulären Kommunikation (Aloisi 2001, Hanisch 2002). Ihre Freisetzung dient der auto- und parakrinen Signalübertragung, membranassoziierte Zell-Zell-Interaktionen, oder sie transportieren biologische Informationen durch Körperflüssigkeiten. Sie regulieren Zellwachstum, Überleben, Differenzierung und andere Aktivitäten. Für diese Prozesse konnte ein Vielzahl verschiedener Zytokine (einschließlich Wachstumsfaktoren) auch bezüglich ihrer Funktionen nachgewiesen werden (Hanisch 2002, Hopkins & Rothwell 1995). Bei infektiösen und autoimmunen Krankheiten des ZNS wurden Gewebe unterwandernde Immunzellen, die mit dem ZNS assoziierten Makrophagen, Mikrogliya und Astrozyten, als Quelle der Zytokine identifiziert, welche spezifisch auf die ZNS-Inflammation wirken (Minagar et al. 2002). Zu den Zytokinen zählt man den TNF- α (tumor

necrosis factor α), IFN (interferon), IL-1 (Interleukin 1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15 und IL-18, TGF- β (transforming growth factors), Colony-stimulation Faktor wie zum Beispiel M-CSF, PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor) und neurotrophe Faktoren wie NGF (nerve growth factor), NT-3 und NT-4 (neurotrophins) oder BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Hanisch 2001).

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α ist ein Produkt von Monozyten/Makrophagen/Mikroglia, dendritischen Zellen oder Lymphozyten, welches Wachstum und Differenzierung reguliert und sich gegen Neuronen, Astrozyten, aber auch Mikroglia richtet. Da Gliazellen oft sowohl als Donor als auch Akzeptor von Zytokinsignalen dienen, wird dadurch der aktivierte Status aufrechterhalten (Hanisch 2002). Die Aktivierung von TNF- α -Rezeptoren ruft multiple und heterogene Effekte hervor, die von Apoptose bis gesteigerter Proliferation reichen (Tan et al. 1999). TNF- α selbst kann toxisch auf Zellen des ZNS einschließlich den myelinproduzierenden Oligodendrozyten und Neuronen wirken, wodurch es zur axonalen Schädigung beiträgt (Drew and Chavis 2000). Aber es wird ihm auch eine protektive Wirkung zugeschrieben, da TNF- α auch an Überleben und Proliferation der Zellen beteiligt ist. So wurden niedrigen TNF- α Konzentrationen sogar eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen (Drew and Chavis 2000, Hanisch 2002, Viviani et al. 2004).

IL-1 ist ein entscheidendes mikrogliales Effektorzytokin, welches eine immunostimulatorische und proinflammatorische Wirkung hat. Während IL-1 α zellassoziiert ist, kommt IL-1 β mehr in der löslichen Form vor (Dinarello 1998, Hanisch 2002). Es konnte gezeigt werden, dass bei Transsektion von Gesichtsnerven neben TNF- α und INF auch die Genexpression von IL-1 β induziert wird. IL-1 β wird wie TNF- α hauptsächlich von aktivierten Mikrogliazellen produziert (Neumann 2001). Ziele von IL-1 β sind T- und B-Zellen, Monozyten und Makrophagen/Mikroglia. Aber neben der Inflammation hat es ebenfalls Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung während der Entwicklung des ZNS und kann die Effizienz von Synapsen von Neuronen modulieren (Hanisch 2002).

Ebenfalls als proinflammatorisch wirkendes Zytokin, wie schon TNF- α und IL-1, wird IL-6 betrachtet, welches an der Initiierung und Koordinierung der inflammatorischen Antwort beteiligt ist und die Ausbreitung von infektiösen Agenzien verhindert. Es kann aber auch antiinflammatorisch wirken (Hanisch 2002). IL-6 kann von T-, B-, Rückenmarks- und Endothelzellen, Makrophagen und verschiedenen Zellentypen des ZNS einschließlich Mikroglia produziert werden. Ziele sind T-, B-, Rückenmarks und Leberzellen (Hanisch 2002). Insbesondere Mikroglia produzieren IL-6 in der frühen Phase von Verletzungen des ZNS und wirken so auf Astrozyten um diese in die Gewebereparatur mit einzubeziehen (Hanisch 2002).

Interleukin IL-10 wird im ZNS synthetisiert und wirkt limitierend auf Symptome von Schlaganfall, Multipler Sklerose, Alzheimer, Meningitis und Veränderung während bakterieller Infektion. Die Expression dieses Zytokines ist während der meisten dieser Krankheiten erhöht und fördert das Überleben von Neuronen und Gliazellen im Gehirn durch Blockierung der proapoptotischen Zytokine (Strle et al. 2001). IL-10 teilt zusammen mit IL-4, IL-13 und TGF- β Formen der antiinflammatorischen, immunsuppressiven und neuroprotektiven Wirkung. In Folge ihrer Ausschüttung wird die Produktion von Zytokinen wie zum Beispiel TNF- α und IL-1 herunterreguliert oder ihr sekundärer Effekt vermindert (Hanisch 2002).

1.3.3.2 Die Rolle von Chemokinen

Eine nicht unwesentliche Bedeutung wird auch der Familie der Chemokine, welche innerhalb des neuronalen Gewebe produziert werden, beigemessen (Aloisi 2001, Hanisch 2002). Chemokine sind kleine Peptide, die basierend auf das Cystein-Motiv in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: CXC, CC, C und CX3C. Sie treten in Wechselwirkung mit der Siebentransmembrandomaine eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, welcher sowohl auf Immunzellen als auch auf Nichtimmunzellen exprimiert sein kann. (Fife et al. 2000, Huang et al. 2000). Während einer Inflammation im ZNS können sie von Immunzellen, Endothelzellen, Astrozyten und Mikrogliazellen produziert werden (Ambrosini & Aloisi 2004). Mechanische Verletzung, neuroinflammatorische Prozesse, Gehirntumore, demyelinisierende Krankheiten wie Multiple Sklerose, virale und bakterielle Infektionen, Schlaganfall und neurodegenerative Prozesse wie bei Alzheimer bewirken ein chemokinvermitteltes Verhalten über konstitutive und hochregulierte Chemokinrezeptoren (Hanisch 2002). Chemokine der CXC bzw. α -Familie wie IL-8 oder IP-10 und der CC oder β -Familie wie MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES werden von Mikroglia produziert und sind beteiligt an der Rekrutierung von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (Cyster 1999). Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Chemokine auch Mikroglia stimulieren können, so dass diese zu der geschädigten Region wandern. So konnte man zum Beispiel *in vitro* Chemokinrezeptoren auf Mikroglia während infektiöser und inflammatorischer Erkrankungen des ZNS nachweisen (Aloisi 2001.)

Eines der wichtigsten Chemokine, welches in die Pathologie der MS involviert ist, ist MCP-1 (monocyte chemoattractant protein - CCL2). Man zählt MCP-1 zu den β -Chemokinen, welche eine gerichtete Migration von Monozyten und T-Lymphozyten bewirken können und mit chronischer Entzündung in Zusammenhang gebracht werden (Simpson et al. 1998). Von Gliazellen ausgeschüttetes MCP-1 aktiviert den entsprechenden Chemokinrezeptor CCR2 und bewirkt so eine Einwanderung von Blutmonozyten in die Bereiche der während MS beeinträchtigten Gewebe. Es gibt aber auch Beweise dafür, dass MCP-1 einen lokalen Effekt auf Zellen des ZNS hat und hier die

Modulierung und Ausschüttung von Zytokinen beeinflussen kann (Brouwer et al. 2004).

Zusätzlich zu den Zytokinen und Chemokinen sind Mikroglia in der Lage costimulatorische Signalmoleküle wie CD80 und CD86 zu exprimieren, welche die primäre Initiierung der antigenspezifischen Immunantwort erlauben (Neumann 2001). Während der ZNS-Inflammation exprimieren aktivierte Mikroglia Adhäsions- und costimulatorische Moleküle wie zum Beispiel CD11a, CD40, CD54, CD80 und CD86, welche essentiell für eine apoptotische Zellfunktion sind (Aloisi 2001). Innerhalb weniger Stunden nach neuronaler Schädigung erhöhen Mikroglia außerdem die Expression von immunverwandten Rezeptoren einschließlich Fc γ rezeptorgebundenes IgG, Komplementrezeptor 3 (CR3 oder $\alpha_M\beta_2$ Integrin) und ICAM-1 (Kreuzberg 1996). Auf diese Weise erlangen Mikroglia eine höhere Beweglichkeit und wandern zu den geschädigten Neuronen und ihren Endigungen, wo sie in direkten Kontakt mit den Neuronen treten können (Neumann 2001). Neuronale Adhäsionsmoleküle sind dann wiederum an der Wechselwirkung zwischen Neuronen und Glia beteiligt. So kann zum Beispiel das neuronale Glycoprotein CD200 mit CD200-Rezeptor-positiven Mikroglia interagieren und so CD11b und CD68 in Mikroglia herunterregulieren (Aloisi 2001, Neumann 2001).

1.4 Mikroglial vermittelte Signalwege

Die Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6 und des Chemokines MCP-1 in Mikrogliazellen unterliegt einem weitverzweigten Regulationsmechanismus. Die wichtigsten Faktoren dieser Regulation sind Proteinkinasen wie Proteinkinasen C und A, Tyrosinkinasen und vor allem MAP-Kinasen, aber auch Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- κ B, Elk-1 und CREB (Woo et al. 2003).

1.4.1 Die Bedeutung von mitogen- und stressaktivierten Kinasen bei inflammatorischen Prozessen

Regulatorische Mechanismen, welche die Proliferation, Differenzierung oder Apoptose von Zellen kontrollieren, sind verbunden mit intrazellulären Proteinkinasen, welche Signale von der Zelloberfläche umwandeln und so eine Veränderung in der Genexpression bewirken (Hagemann and Blank 2001). Hierbei spielen MAP-Kinasen eine wesentliche Rolle. Sie phosphorylieren spezifisch Serin- und Threoninreste der Zielproteine und regulieren so die zelluläre Aktivität, welche von Genexpression, Mitose, Bewegung innerhalb der Zelle und Metabolismus bis zum Zelltod reichen (Johnson and Lapadat 2002). Es gibt drei gut charakterisierte Kinase-Signalwege, die entweder über die extrazellulär-signalregulierte Kinase (ERK1/2) oder die stressaktivierte

Proteinkinase (p38/SAPK2 oder JNK/SAPK) gehen (Irving and Bamford 2002, Kyosseva 2004). Jeder dieser Signalwege besteht aus mitogenaktivierten Proteinkinase(MAPK)-Kaskaden, deren Komponenten eine hoch konservierte Struktur und Organisation aufweisen. Jede Kaskade besteht aus einem Modul von drei zytoplasmatischen Kinasen: die mitogenaktivierte Protein(MAP)-Kinase-Kinase (MAPKKK), die MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und die MAP Kinase (MAPK) selbst. Die MAPKKK ist eine Serin-Threonin Kinase, welche meist ein aktivierendes Signal von einem Membranrezeptor erhält und dann sein Substrat die MAPKK phosphoryliert und somit aktiviert. Diese ist eine doppelt-spezifische Kinase mit dem Potential Threonin- und Tyrosinreste an seinem Substratprotein, der MAPK, zu phosphorylieren. Diese MAPK repräsentieren eine Serin-Threonin-Kinase-Familie mit der Möglichkeit, andere zytoplasmatische Proteine zu phosphorylieren und diese in den Zellkern zu bringen, wo sie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren und so die Genexpression kontrollieren (Hagemann and Blank 2001, Irving and Bamford 2002, Johnson and Lapadat 2002).

MAP Kinasen, einschließlich ERK, JNK und p38, sind beteiligt an der Entstehung von Krankheiten im ZNS. Ihre phosphorylierte Form spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der EAE. So konnte man im Rückenmark von EAE-Ratten während des sich verstärkenden Krankheitsbildes einen Anstieg von p-ERK, p-JNK und p-p38 messen und in der Erholungsphase gingen p-ERK und p-JNK wieder leicht zurück. Weiterhin wurde beobachtet, dass hier p-ERK hauptsächlich in Gehirnzellen wie Astroglia vorkam, wogegen p-JNK und p-p38 auch in T-Zellen der EAE-Läsionen nachgewiesen werden konnte (Raine 1984, Shin et al. 2003).

1.4.1.1 Die Signalwege ERK1/2, p38 und JNK/SAPK

Der mitogen-stimulierte ERK1/2-Signalweg moduliert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die sich auf die Proliferation und Differenzierung auswirken. Im Gegensatz dazu werden der p38/SAPK2- und der JNK/SAPK(c-Jun amino-terminal kinases/stress-activated protein kinase)-Signalweg nur schwach durch mitogene Signale aktiviert. Die Aktivierung erfolgt in diesem Fall hauptsächlich durch Stressstimuli wie zum Beispiel das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) und die Zytokine IL-1 und TNF- α . Das führt dann zu einer veränderten Transkription, Translation und Aktivierung von Faktoren, welche am Überleben der Zellen und an der Inflammation beteiligt sind (Irving and Bamford 2002). Anfangs ging man davon aus, dass mitogen- und stressaktivierte Signalwege unabhängige, intrazelluläre Signalwege sind. Es gibt jedoch mittlerweile viele Hinweise, dass diese auch untereinander vernetzt sind. So aktivieren der ERK1/2- und auch der p38/SAPK-Signalweg Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, Sap-1a und CREB (cyclic AMP response element binding proteine) (Bourtchuladze et al. 1994).

Die zwei ERK-MAPK-Isoformen p44 MAPK und p42 MAPK werden auch als ERK1 und ERK2 bezeichnet und konnten in Neuronen des ZNS nachgewiesen werden (Shin et al. 2003, Sweatt 2001). Beide Kinasen sind Komponenten eines „Drei-Kinasen-Phosphorelay“, welches MAPKKK, C-Raf1, B-Raf1 und A-Raf einschließt (Johnson and Lapadat 2002). ERK1 und ERK2 können durch die zwischengeschalteten MAPKK MEK1 und MEK2 (ERK-Kinase) aktiviert werden (Dong et al. 2002). Auch Proliferationssignale wie Wachstumsfaktoren bewirken eine Aktivierung und Autophosphorylierung. Einer der bekanntesten und häufigsten Signalwege jedoch ist der Raf-MEK-ERK-Signalweg. Unter normalen Bedingungen wird dieser hauptsächlich durch Mitogene oder durch oxidativen Stress aktiviert und bewirkt eine Translokation von ERK1/2 in den Zellkern und stimuliert so Transkriptionsfaktoren, die in Proliferation, Überlebensstrategien, Bewegungen und Differenzierung involviert sind (Hagemann and Blank 2001, Irving and Bamford 2002, Shin et al. 2003). Des Weiteren ist dieser Ras/Raf-ERK-Signalweg beteiligt an der Differenzierung von unentwickelten Thymozyten (Rincón et al. 2000). Der ERK Signalweg spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei neurotropher Signalübertragung und Zelltod (Hagemann and Blank 2001, Irving and Bamford 2002, Satoh et al. 2000). Auch kann der ERK1/2-Signalweg durch den p38-Signalweg aktiviert werden. So konnte man in einer Reihe von Studien einen Anstieg der Aktivität von p38, ERK und JNK nach Schädigung des Gehirns zeigen (Irving and Bamford 2002).

Eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von Signalen spielt der p38-Signalweg. Er ist an der Überlebensstrategie der Zelle, Apoptose und Inflammation beteiligt und wird ebenfalls assoziiert mit neuronalem Zelltod und Apoptose. Dieser Signalweg kann relativ schnell durch die Zytokine TNF- α und IL-1 β aktiviert werden (Xia et al. 1995, Raingeaud et al. 1995). Die MAP-Kinase p38 wird durch die MAPKK MKK3, MKK4 und MKK 6 phosphoryliert. Als Substrat für die p38-MAP-Kinase gelten verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, CHOP, MEF2C, SAP-1 und ATF2 (Rincón et al. 2000). Auch ein Einfluss auf p38 hat der NGF (nerve growth factor), dessen Abnahme eine verringerte Aktivität von ERK und eine gesteigerte Aktivität von p38 und JNK bewirkt. Dies zeigt, dass sowohl ERK als auch stressaktivierte Kinasen am Überleben der Zelle beteiligt sind (Irving and Bamford 2002). Die Aktivierung der p38-MAP-Kinase induziert Apoptose in CD8⁺-T-Zellen, aber nicht in CD4⁺-T-Zellen. Deshalb spielt diese MAP-Kinase eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität (Produktion von IL-12 durch dendritische Zellen und Makrophagen), T-Zell-vermittelte Immunität (IFN- γ Produktion durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) und T-Zell-Homeostase (CD8⁺ und CD4⁺ T-Zelltod) (Rincón et al. 2000).

Die Aktivierung des JNK/SAPK Signalweges erfolgt durch ähnliche Stimuli wie p38 und wird assoziiert mit der Induktion von Apoptose, Schutz vor Zelltod, Proliferation und Differenzierung (Martin et al. 1996). Über die Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosinreste hauptsächlich

durch die MAPKK MKK4 und MKK7 erfolgt die Aktivierung der JNK-Kinase. Man konnte für JNK verschiedene Substrate identifizieren. Transkriptionsfaktoren wie C-Jun, D-Jun, Elk-1, ATF α , ATF-2 und Sap-1 werden von ihr phosphoryliert und aktiviert (Rincón et al. 2000, Schonhoff et al. 2001). C-Jun ist eine Komponente des AP-1, welches an der Kontrolle von Zytokinen beteiligt ist (Johnson and Lapadat 2002). Bei Säugetieren konnte man drei Isoformen dieser Kinase identifizieren. JNK1 und JNK2 werden in allen Geweben exprimiert, während JNK3 hauptsächlich im ZNS gefunden wurde (Dong et al. 2002, Martin et al. 1996, Rincón et al. 2000). Die Aktivität von JNK im Gehirn wird zum Teil durch das Protein JIP-1 (JNK-interacting protein-1) reguliert, welches seine Phosphorylierung und Translokation in den Zellkern inhibiert (Dickens et al. 1997). Es gibt Studien, die zeigen, dass JNK auch an dem durch freie Radikale vermittelten Zelltod beteiligt ist (Tsuji et al. 2000).

1.4.2 Rolle von Transkriptionsfaktoren

Die Signalübertragung über MAP-Kinasen repräsentiert einen bedeutenden Mechanismus der Weiterleitung von Information der Zelloberfläche über Rezeptoren zum Zellkern, wo die Genregulation mittels bestimmter Transkriptionsfaktoren erfolgt. Zu den durch MAP-Kinasen-Phosphorylierung regulierten Transkriptionsfaktoren gehören zum Beispiel Elk-1, CREB, cMyc, c-Jun, c-Fos oder NF- κ B (Davis 1995). Die aktivierte ERK-Kinase kann in den Zellkern einwandern und dort Transkriptionsfaktoren wie CREB (cAMP-response-element binding protein) und Elk-1 direkt aktivieren, welche dann in der Promotorgenregion an das „cAMP-response-element“ (CRE) bzw. an das Serum-Response-Element (SRE) binden (Ru-Rong et al. 2003). Die MAP-Kinase JNK ist ebenfalls in der Lage eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren. Einmal aktiviert löst sie sich von ihrem Verankerungskomplex im Zytosol und wandert in den Zellkern ein, wo sie eine Verbindung mit ihren Kernsubstraten wie den Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2 und Elk-1 eingehen kann (Zhu et al. 2002).

Der Transkriptionsfaktor CREB kann durch verschiedene externe und interne Stimuli wie z. B. Zytokine oder oxidativen Stress aktiviert werden (Johannessen et al. 2004). Seine Regulation wird sowohl komplex als auch einfach beschrieben. Sie ist komplex in dem Sinne, dass CREB von verschiedenen Kinasen aktiviert und phosphoryliert werden kann, und einfach weil jede Kinase diesen Transkriptionsfaktor in der gleichen Weise am Serin 133 phosphoryliert (Adams und Sweatt 2002). CREB aktiviert die Transkription von Genen mit der CRE-Sequenz als Reaktion auf einen Anstieg des cAMP und der Ca²⁺-Levels. (Bourtchuladze et al. 1994) Einige Stimulatoren können CREB, über einen geteilten Signalweg der p38 und ERK1/2 verwendet, aktivieren (Irving and Bamford 2002).

Zytokine wie IL-1 und TNF- α aktivieren eine Signalkaskade, welche dann zur Aktivierung des Aktivatorprotein-1 (AP-1) und dem NF- κ B Transkriptionsfaktor führt. Das wiederum führt zur Regulierung von Genen, welche an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. NF- κ B wird reguliert von einem Proteinkomplex I κ B (Inhibitor von NF- κ B), welcher den NLS (nuclear localisation signal) blockiert und NF- κ B im Zytosol hält. Die Phosphorylierung von I κ B führt zu seiner Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom und erlaubt so NF- κ B die Translokation in den Zellkern und die Aktivierung der Gene (Hagemann and Blank 2001, Karin and Ben-Neriah 2000).

1.4.3 Bedeutung und Funktion der PARP-1 – Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1

Eine Schlüsselrolle in der Regulierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B), ein Transkriptionsfaktor, der essentiell für die Immun- und Stressantwort im Gehirn ist, hat die PARP-1 (Chiargui and Moskowitz 2001). *In vivo* Studien haben gezeigt, dass die PARP für eine NF- κ B abhängige Genexpression unabdingbar ist. Die PARP-1 bildet einen nukleären Komplex mit der großen Untereinheit p65 von NF- κ B. Es wurde jedoch auch bestätigt, dass die PARP-1 mit beiden Untereinheiten (p65 und p50) interagieren kann. So zeigte eine Darstellung der Interaktionsdomänen, dass beide Untereinheiten mit verschiedenen Domänen in Wechselwirkung treten. Dabei findet die transkriptionale Aktivierung der PARP, unabhängig von der enzymatischen Aktivität oder der Fähigkeit DNA zu binden, statt. Die PARP fungiert hier als spezifischer transkriptionaler Co-Aktivator (Hassa et al. 2001).

In eukaryotischen Zellen kommt es nach DNA-Schädigung zu einer kovalenten, posttranslationalen Modifikation der nukleären Kernproteine mit Poly(ADP-ribose) aus β -Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺) als Vorläufer. Meistens wird dies katalysiert durch die Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) (Bürkle 2001, De Murcia & Shall 2000, Ullrich et al. 2000). Die Poly(ADP-ribosyl)ierung wirkt an der DNA-Basen-Austauschreparatur, an Signalwegen nach DNA-Schädigung, Regulation der genomischen Stabilität und Regulation der Transkription und der proteasomalen Funktion mit und ist in Differenzierungs- und Proliferationsprozesse involviert (Bürkle 2001, Griesenbeck et al. 1997). So wurde in proliferierenden Zellen eine viel höhere PARP-Aktivität gemessen als in ausdifferenzierten Zellen. Eine veränderte PARP-Expression bzw. Aktivität wurde ebenfalls während Differenzierungsprozessen in einer Vielzahl von Tumorzellen, einschließlich leukämischer Zellen, Osteosarkomazellen oder Keimzellen gefunden (Ullrich et al. 2000).

Poly(ADP-ribosyl)ierung ist eng verbunden mit DNA-Reparatur. Sie wird durch die PARP-1 gewährleistet und bewirkt dadurch einen Schutz der DNA vor Strangbrüchen, moduliert die Chromatinstruktur und rekrutiert Reparationsenzyme. Die PARP bindet an die DNA-Strangbrüche und die Auto-poly(ADP-ribosyl)ierung des Proteins bewirkt dann seine Freisetzung und erlaubt so

den Reparaturenzymen einen Zugang zur DNA (Mayer-Kuckuk et al. 1999, Ullrich et al. 1999). Eine andere Funktion der Poly(ADP-ribosyl)ierung ist das so genannte „shuttling“ der Histone durch Verbinden und Lösen der Histone von den Chromatinen über die reversible Poly(ADP-ribose)-Synthese und -Abbau (Ullrich et al. 1999). Unter genotoxischem Stress jedoch kommt es zu einer Überaktivierung der PARP-1 und zur Entleerung des NAD^+ - und ATP-Pools, was wiederum zum Zelltod durch Energieverlust führen kann (Chiarugi and Moskowitz 2003). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass solche Zelltodmechanismen verantwortlich sind für Zellschädigungen, hervorgerufen durch aus Sauerstoff abgeleiteten, freien Radikalen wie NO oder Peroxynitrit (Hassa et al. 2001). Das humane Gen, welches die 113kDa Poly(ADP-Ribose)Polymerase kodiert, wird auch mit pADPRT (Poly(ADP-Ribosyl)-Transferase) bezeichnet (Bürkle 2001, Griesenbeck et al. 1997, Smith 2001).

Poly(ADP-ribosyl)ierung ist eine starke Modifizierung der Glutamat-, Aspartat- und Lysinreste von nukleären Proteinen (Akzeptorproteinen) und ist die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung, alkylierenden Agenzien oder Oxidanzien (Bürkle 2001, De Murcia & Shall 2000). Es gibt eine Vielzahl von Akzeptorproteinen wie zum Beispiel Histone, Topoisomerase I und II, DNA-Polymerase, p53 und die PARP selbst (Ullrich et al. 2001b). Die kovalente Modifizierung der Proteine resultiert in einer Herunterregulierung ihrer Funktion (Griesenbeck et al. 1997). Die ADP-ribose Polymere werden durch sequenzielles Anhängen von ADP-ribosyl-Teilen aus NAD^+ gebildet und können eine hohe Komplexizität, mit einer Kettenlänge von bis zu 200 Einheiten und mehreren Verzweigungspunkten, erreichen. Dadurch wird eine starke Akkumulation von negativer Ladung erreicht. Das Hauptenzym, welches diesen Poly(ADP-ribose)-Katabolismus katalysiert, ist die Poly(ADP-ribose)glycohydrolase (PARG) und spaltet die Polymereinheiten an der Ribose-Ribose-Verbindung. Es kommt also nach DNA-Schädigung nicht nur zu Bildung von Poly(ADP-Ribose), sondern auch monomerer ADP-Ribose, ein reduzierender Zucker aus dem PARG-vermittelten Poly(ADP-Ribose)-Abbau (Bürkle 2001, De Murcia & Shall 2000, Jacobson & Jacobson 1999, Smith 2001).

Die PARP ist in viele Prozesse der Zellschädigung involviert und wird von verschiedenen Stellen reguliert. So ist die PARP-1 nachweislich beteiligt, wenn aktiver Sauerstoff als Tumorpromotor wirkt und zu Zelltransformationen führt (Ullrich et al. 1996). Es wurde weiterhin *in vivo* gezeigt, dass das Lipidperoxidationsprodukt HNE (4-Hydroxynonenal), welches in inflammatorischen Geweben über Lipidperoxidation gebildet wird, die Poly(ADP-ribose)-Synthese inhibiert und die Reparatur von durch aktiven Sauerstoff geschädigter DNA verhindert (Ullrich et al. 1996). In intakten Zellen kann die PARP-1 selbst auch als Akzeptorprotein fungieren (Automodifizierung) und wird teilweise sogar als Hauptziel für den Transfer von ADP-Ribose-Einheiten beschrieben. Ein immunochemischer Vergleich von modifizierter und nicht modifizierter PARP zeigte jedoch, dass nur ein geringer Anteil

der PARP poly(ADP-Ribosyl)iert wurde (Bürkle 2001, Griesenbeck et al. 1997).

Die PARP besteht aus drei funktionellen Domänen. Die aminoterminal DNA-Bindungsdomäne, welche als Sensor dient, umfasst ein Zwei-Zinkfinger-Motiv und ein zweiseitiges nukleäres Lokalisationssignal. Die Zinkfingerdomäne zeigt eine hohe Affinität für Einzelstrangbrüche der DNA. Die zentrale Region enthält die Poly(ADP-ribosyl)ierungsstelle und eine zweite DNA-Bindestelle für interne DNA-Strukturen. Im C-Terminalen Teil des Enzyms ist die katalytische NAD⁺-Bindedomäne (Griesenbeck et al. 1997). Neben der PARP-1 wurden noch vier weitere PARPs identifiziert: PARP-2, PARP-3, vault-PARP und Tankyrase. Die Homologie ist auf den C-Terminus beschränkt. Alle PARP-Homologe unterscheiden sich im N-Terminus (Hassa et al. 2001).

Die Proteininteraktion der PARP ist abhängig vom Ausmaß der Automodifikation und der Präsenz der DNA. Die Präsenz von geschädigter DNA steigert die katalytische Aktivität der PARP (Griesenbeck et al. 1997). So können Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche die PARP-Aktivität um das 500fache steigern (Bürkle 2001). Während poly(ADP-ribosyl)ierte PARP vorzugsweise mit anderen Proteinen interagiert, ist die Wechselwirkung des oligo(ADP-ribosyl)ierten Enzyms mit Kernproteinen schwächer als mit sich selbst. Es wurde gezeigt, dass poly(ADP-ribosyl)ierung die Enzymaktivität inhibiert, was die Dissoziation des automodifizierten Enzyms von der aktivierenden DNA begründet. Die PARP kann nun spezifisch mit Kernproteinen in Wechselwirkung treten (Griesenbeck et al. 1997).

PARP-1 fällt eine zentrale Rolle bei neuronalem Zelltod zu. Nach zellulärer Schädigung durch Stressfaktoren wie freie Radikale und toxischen Zytokinen, die nach oxidativer Zellschädigung in großen Mengen von Makrophagen und Mikroglia freigesetzt werden, kommt es zu einer schnellen und starken Aktivierung der PARP-1. Ebenfalls stark aktiviert kommt dieses Enzym in phagozytierenden Mikrogliazellen vor (Eliasson et al. 1997, Ha & Snyder 2000, Ullrich et al. 2001b). Die PARP-1 reguliert hier die Expression von Integrinen an der Zelloberfläche der Zellen über eine direkte Protein-Protein-Interaktion von NF- κ B mit der aktivierten PARP-1. Das Protein HMG-I(Y) ist ebenfalls an dieser Wechselwirkung beteiligt und erleichtert die Bindung von NF- κ B und die nachfolgende Aktivierung der iNOS (Perrella et al. 1999, Ullrich et al. 2001b).

1.4.4 Die Rolle von Scavenger-Rezeptoren

Scavenger-Rezeptoren können auch als Myelinrezeptoren fungieren. Es handelt sich hierbei um integrale Membranglycoproteine, welche ein breites Spektrum von Makromolekülen erkennen können (Eto et al. 2003). Es wurden zwei Hauptgruppen für Scavenger-Rezeptoren identifiziert und als Typ A und Typ B bezeichnet, welche in der Lage sind, oxLDL (oxidized low density lipoprotein)

zu binden und aufzunehmen. Zusätzlich wurden noch zwei weitere Makrophagenrezeptoren gefunden. Dazu zählen MARCO (macrophage receptor with a collagenous structure) und CD68 (macrosialin), welche ebenfalls in der Lage sind, modifizierte Lipoproteine aufzunehmen (Han et al. 1999). Ein Scavenger-Rezeptor der Klasse B ist CD36, welcher auf Monozyten/Makrophagen und mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert wird. Dieser Rezeptor erkennt eine Vielzahl von Liganden wie zum Beispiel oxLDL, anionische Phospholipide, Trombospondin, Kollagen und apoptotische Zellen (Eto et al. 2003). Auf phagozytierenden Zellen fungiert CD36 als Scavenger-Rezeptor, erkennt Lipide, die auf Membranen von apoptotischen Zellen und oxLDL präsentiert werden und nimmt diese auf (Silverstein and Febbraio 2000). OxLDL bestehen aus vielen potenziellen Molekülen einschließlich Oxysterolen. Eines davon ist 7-Ketocholesterol, welches in hohen Mengen in oxLDL vorkommt. Es gibt Studien, die zeigen, dass 7-Ketocholesterol eine gesteigerte Expression von Scavenger-Rezeptoren in menschlichen Monozyten fördern kann (Hayden et al. 2002). Die komplexe Funktion von CD36 lässt vermuten, dass dieses Molekül eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Energiehomeostase, der Förderung des immunologischen Überlebens und der Modellierung der Immunantwort spielt (Silverstein and Febbraio 2000). So konnte gezeigt werden, dass CD36 eine wichtige Rolle im Lipoprotein und Lipidmetabolismus spielt (Febbraio et al. 2000).

In immunohistochemischen Studien von MS-Gehirnen wurden eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen wie zum Beispiel ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und CD36 beobachtet (Dobbie et al. 1999). Auch in Makrophagen spielt CD36 eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von oxLDL und hat hier eine Schlüsselrolle bei der Beseitigung von abgebautem Myelin und bei der Remyelinisierung nach Nervenschädigung des Ischiasnerves in Mäusen. CD36 scheint hier ebenfalls stärker an der Beseitigung von degradiertem Myelin beteiligt zu sein als zum Beispiel SR-A I/II (Eto et al. 2003).

Han et al. (1999) konnten zeigen, dass zelluläres Cholesterol die Expression von CD36 steigert und dass das Cholesterol aus abgebautem Myelin in Makrophagen die Expression von CD36 ebenfalls steigert. Dieser Scavenger-Rezeptor wird nicht nur durch LDL und Cholesterol hochreguliert, sondern auch durch IL-4, MCSF (macrophage colony stimulating factor) und PPAR- γ -Liganden (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) (Febbraio et al. 2000). Die Aktivierung des p38-Signalweges ist nötig für die Aktivierung des PPAR- γ , einem nukleären Rezeptor in Monozyten/Makrophagen, welcher eine Rolle bei der oxLDL induzierten Expression von CD36 spielt. (Zhao et al. 2002) Verschiedene inflammatorische Mediatoren wie LPS, IL-1 und TGF- β , aber auch die Verringerung des Membrancholesteroles, bewirken eine Herunterregulation der CD36-Expression (Silverstein and Febbraio 2000). Moore et al. (2002) zeigten, dass β -Amyloid CD36 im

Zusammenhang mit der Src-Phosphotyrosinkinase (PTK) Lyn induziert und eine Signalkaskade aktiviert, die ebenfalls andere Src-Kinase involviert wie Fyn und p44/42. Eine Inhibierung dieser Kaskade bewirkte eine Hemmung der Immunantwort von Makrophagen durch β -Amyloid, einschließlich der ROS- und Chemokinproduktion (Moore et al. 2002).

1.5 Neuronen und Oligodendrozytenschädigung durch oxidativen Stress

Auf Grund seines hohen metabolischen Umsatzes und seiner geringen Kapazität für zelluläre Regeneration im Vergleich zu anderen Organen gilt das Gehirn als besonders anfällig für oxidativen Stress (Andersen 2004). Bei Demyelinisierung und Inflammation während Multipler Sklerose sind T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Mikroglia beteiligt, was kennzeichnend ist für diese Krankheit. Die Gewebeschädigungen bewirken einen Verlust sowohl von Neuronen und Astrozyten als auch Oligodendrozyten (Hartung und Rieckmann 1997, Lassmann et al. 1998, Hemmer et al. 2002). Betrachtet man das ZNS, wird das Gehirn an sich als stärker verwundbar eingestuft als das Rückenmark und die peripheren Nerven (Smith et al. 1999).

1.5.1 Oligodendrozytenschädigung

Im ZNS haben die Oligodendrozyten ein ziemlich kleines Repertoire an antioxidativer Abwehr, was sie sehr anfällig für oxidative Schädigung macht. Somit ist die Myelinmembran ein bevorzugtes Ziel von reaktiven Sauerstoffspezien (Smith et al. 1999). Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass myelinproduzierende Zellen wie Oligodendrozyten sehr empfindlich reagieren auf eine Toxizität, die durch das Komplementsystem, Antikörper, Zytokine, freie Sauerstoffradikale und Stickstoffoxid von Makrophagen hervorgerufen wird (Parkinson et al. 1997).

Der Prozess der Demyelinisierung während Multipler Sklerose wird für gewöhnlich stark assoziiert mit der Schädigung und dem Verlust von Oligodendrozyten, obwohl dies sehr stark zwischen den verschiedenen Patienten variieren kann. Der Mechanismus, durch den diese Schädigung erfolgt, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt (Lucchinetti et al. 1999). Peroxynitrit und stickstoffoxidverwandte Spezies können Oligodendrozyten schädigen (Smith und Lassmann 2002). Oligodendrozyten und Myelin können durch Peroxynitrit-vermittelte Lipidperoxidation geschädigt werden, was nicht nur die Membranfluidität und Permeabilität, sondern auch die Eigenschaften der Membranproteine beeinträchtigt. Die durch Peroxynitrit hervorgerufenen Lipidmodifikationen können dann von Makrophagen-Scavenger-Rezeptoren erkannt werden, was ebenfalls eine

Relevanz für den Prozess der Demyelinisierung hat (van der Veen und Roberts 1999, Graham et al. 1993).

Die Phagozytose von ZNS-Myelin kann Makrophagen und Mikroglia stimulieren, welche dann wiederum NO produzieren und so ein positives Feedback bewirken (Smith und Lassmann 2002). Es ist bekannt, dass Oligodendrozyten anfälliger für NO-Toxizität sind als Astrozyten oder Mikroglia. NO wird deshalb hierbei eine besondere Rolle beigemessen. Es kann über Nekrose oder Apoptose den Zelltod induzieren und sein Effekt kann durch DNA-Strangbrüche und die nachfolgende energieverbrauchende Wirkung der PARP-1 vermittelt werden (Smith und Lassmann 2002).

Eine Reihe von Abwehrmechanismen sollen die Zelle vor oxidativer und nitrosativer Schädigung schützen, indem sie die Produktion der reaktiven Spezies reduzieren, Radikale wegfangen und die Schäden, die trotzdem entstehen, minimieren. Dies wird durch die Präsenz verschiedener Enzyme wie die Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathionperoxidase und –katalase, aber auch Antioxidantien wie Glutathion und Vitamin C und E erreicht (Smith et al. 1999). Die zelluläre Superoxid-Dismutase (SOD) wandelt O_2^- in H_2O_2 um, welches dann durch Katalasen und Peroxidasen aus dem Zytoplasma und durch die NADPH-abhängige Glutathionperoxidase aus Mitochondrien weiter zu Wasser reduziert wird (Mikkelsen and Wardman 2003).

1.5.2 Neurodegeneration durch oxidativen Stress

Wenn die Bildung von Oxidantien die Konzentration der Antioxidantien übersteigt, welche Proteine, Lipide, DNA und andere Makromoleküle durch Abfangen der Oxidantien schützen, werden diese Ziele oxidativer Modifikationen (Ischiropoulos und Beckmann 2003). Bei neurodegenerativen Krankheiten sind Neuronen besonders anfällig für solchen oxidativen Stress (Mattson 2004). Axonale Degeneration wurde schon sehr früh als eine der wichtigsten Veränderung erkannt, die verantwortlich ist für die bei MS auftretenden Defizite (siehe auch 1.1) (Kornek und Lassmann 1999). Das Ausmaß der Neuronenschädigung ist teilweise abhängig von der Zahl der zytotoxischen T-Zellen. Besonders beeinflusst ist dies durch die Anzahl der aktivierten Makrophagen/Mikroglia. Diese produzieren inflammatorische Mediatoren wie z. B. NO, welche den Schädigungsprozess dann noch weiter vorantreiben (Smith und Lassmann 2002).

1.5.2.1 *Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies*

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS - reaktive oxygen/nitrogen species) spielen eine Rolle bei Demyelinisierung, wie sie bei inflammatorischen, demyelinisierenden Krankheiten, wie zum Beispiel Multipler Sklerose vorkommt (Smith et al. 1999). Aktivierte Mikroglia setzen neben pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen auch Stickstoffoxid und

Superoxidradikale frei (Cross et al. 2001). Im Normalzustand sind die Konzentrationen von ROS und RNS relativ gering. Kommt es jedoch zur Inflammation, steigt ihre Produktion dramatisch an und übergeht das Zellabwehrsystem. Das wiederum führt zu oxidativem und nitrosativem Stress (Smith et al. 1999, Vaziri et al. 2004). Oxidativer Stress ist eng verbunden mit anderen Komponenten des degenerativen Prozesses, wie mitochondrialer Fehlfunktion, Exitotoxizität, NO-Toxizität und Inflammation, und führt zu Veränderung von einzelnen Molekülen wie Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren (Giasson et al. 2002, Jenner 2003, Smith et al. 1999). Die ROS können verschiedene Downstream-agierende Signalmoleküle aktivieren. Dazu gehören die Proteinkinase C, die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) und der nukleäre Faktor- κ B (NF- κ B). Auf diese Weise regulieren sie die Expression von Genen, welche eine Vielzahl von proinflammatorischen Faktoren kodieren (Wang et al. 2004). Produkte aus oxidativer Schädigung, wie zum Beispiel 4-Hydroxynonenal (HNE), schädigen das 26S Proteasom und dessen verschlechterte Funktion führt zur Freisetzung von freien Radikalen und so mit zu oxidativem Stress (Jenner 2003).

Zu ROS und RNS zählt man Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$ - Superoxid), Stickstoffoxid ($^{\bullet}NO$ – Stickstoffmonoxid), Peroxynitrit ($ONOO^-$ - ein Produkt aus Superoxid und Nitritoxid), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal ($^{\bullet}OH$). Andere potenzielle Spezies sind Singulett Sauerstoff (1O_2), Stickstoffdioxidradikal ($NO_2^{\bullet}$), Nitrosonium (NO^+) und Nitronium (NO_2^+), Perhydroxylradikal ($HO_2^{\bullet}$) und Hypochlorsäure (HOCl) (Fubini & Hubard 2003, Mikkelsen and Wardman 2003, Smith et al. 1999). Zellen wandeln die oxidativen Signale meistens in ein nitrosatives Signal um, weil die ROS zu reaktiv und zu unspezifisch in ihren regulatorischen Eigenschaften sind, so dass, obwohl die ROS oft die initialen Reaktanten aus einem ionisierenden Ereignis sind, die RNS die Rolle des Effektors/Aktivators von redoxabhängigen zellulären Signalwegen übernehmen (Mikkelsen and Wardman 2003).

Im Körper wird primär das freie Sauerstoffradikal Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) produziert, welches unter normalen Bedingungen als Nebenprodukt der zellulären Atmung der Mitochondrien entsteht oder durch die Plasmamembran-NADPH-Oxidase gebildet wird. Andere Quellen von ROS sind die Xanthinoxidase, Lipoxygenase und Cyclooxygenase, aber auch nichtenzymatische Mechanismen wie die Autooxidation von Dopamin und Noradrenalin werden dazu gezählt (Mikkelsen and Wardman 2003, Smith et al. 1999, Vaziri et al. 2004). Jedoch unter pathologischen Bedingungen bilden aktivierte Leukozyten und Makrophagen große Mengen an Superoxid und anderen reaktiven Sauerstoffspezies, welchen dann als Immuneffektoren wirken (Vaziri et al. 2004). Mikroglia werden besonders stark in inflammatorischen, demyelinisierten Läsionen aktiviert, was wiederum die ROS-Produktion, insbesondere Superoxid als Teil der gestörten mitochondrialen Atmung, steigert (Smith

et al. 1999).

1.5.2.2 NO und iNOS

Stickstoffmonoxid (NO) wird aus L-Arginin von der Nitridoxidsynthetase (NOS) gebildet und benötigt verschiedene Co-Substrate und Co-Faktoren wie Sauerstoff und NADPH. Es gibt drei verschiedene Formen der NOS, nNOS (neuronale NOS/NOS I), eNOS (endotheliale NOS/NOS III) und die iNOS (immunologische, inflammatorische oder meistens induzierbare NOS/NOS II) (Moro et al. 2004, Shareef et al. 1999). NO reagiert mit freien Sauerstoffradikalen und bildet hochreaktive zytotoxische Produkte wie Peroxynitrit (ONOO^-) und Peroxynitrosäure (ONOOH) (Vaziri et al. 2004). Peroxynitrit kann Schäden in Makromolekülen wie Oxidation von DNA, Einzelstrangbrüche, Lipidperoxidation, Bildung von Proteincarbonylen und die Oxidierung verschiedener Aminosäuren bewirken (Giasson et al. 2002). Im Vergleich zur nNOS und eNOS, welche in Neuronen und Endothelzellen exprimiert werden, produziert die iNOS erheblich mehr NO. Die iNOS wird vorwiegend in Astrozyten und Mikroglia, aber auch teilweise in Oligodendrozyten, Schwannzellen und im cerebralen Endothelium exprimiert (Moro et al. 2004, Mikkelsen and Wardman 2003, Smith et al. 1999). Die Kontrolle der Expression erfolgt hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene und bezieht Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B mit ein. NO ist auch an der eigenen Regulation in Form von negativem Feedback beteiligt (Smith et al. 1999).

Weiterhin hat NO sowohl eine immunoregulatorische als auch eine immunsuppressive Wirkung auf aktivierte proinflammatorische Makrophagen und T-Lymphozyten, die während Multipler Sklerose involviert sind. Neben der Immunantwort ist NO aber auch an der Modulation der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und der Wanderung von Zellen im ZNS beteiligt (Parkinson et al. 1997). *In vivo* und *in vitro* Studien konnten zeigen, dass NO auch als antioxidatives Agens wirken kann. Es fängt kurzlebige, hochreaktive freie Radikale wie das Superoxidanion (O_2^-), $^*\text{OH}$, Peroxylipidradikale (LOO^*) und andere ab. Dabei entstehen verschiedene Stickstoffspezies wie Nitrit, Nitrat, S-Nitrosoglutathion (GSNO) und Peroxynitrit (ONOO^-). GSNO inhibiert den peroxidativen Effekt von ONOO^- , während CO_2 und NO den peroxidativen Effekt von ONOO^- neutralisieren und so Proteinoxidationen verhindern (Chiueh 1999, Mikkelsen and Wardman 2003).

An der Hochregulation der NO-Produktion sind, wie man an Primärkulturen von Gliazellen aus Ratten zeigen konnte, auch mitogenaktivierte Proteinkinasekaskaden beteiligt. So konnte mit der Inhibierung von ERK (extracellular signal-regulated kinase) und p38 die Expression der iNOS und die Produktion von NO reduziert werden (Bhat et al. 1998). ONOO^- induziert die Nitrierung von Tyrosinen und so die Aktivierung von p38, JNK und MAPK (Mikkelsen and Wardman 2003). Direkte Wechselwirkung mit DNA oder DNA-Strangbrüche können aber auch die PARP aktivieren, was

wiederum zur Entleerung des NAD^+ - und ATP-Depots führt (Smith et al. 1999, Szabo 2003). Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ die iNOS und NO induzieren können, während NO und/oder ONOO^- direkt die Produktion von $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 und H_2O_2 hochregulieren können (Parkinson et al. 1997).

Des Weiteren diskutiert man alle drei MAP-Kinase-Signalwege in Zusammenhang mit der iNOS Regulation. NO oder NO-relevante Spezies werden als wichtige Regulatoren der MAP-Kinase Signalwege beschrieben (Schonhoff et al. 2001). $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ und eine Vielzahl anderer Stimuli initiieren die Transkription der iNOS über die Aktivierung der verschiedenen MAP-Kinasen, wie ERK1/2, JNK/SAPK und p38, was wiederum die Transaktivierung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B und AP-1, nach sich zieht (Chan et al. 1999).

Wie schon erwähnt, steht die PARP ebenfalls im Zusammenhang mit NO. Sie reguliert zusammen mit NF- κ B die Genexpression der iNOS und des P-Selektin Promotors (Hassa et al. 2001). Aktivierung von Zellen zum Beispiel nach septischem Schock, Schlaganfall oder Ischämie bewirkt die Induktion von NF- κ B, welches zusammen mit PARP-1 wiederum bestimmte Gene (iNOS oder P-Selektin) aktiviert. Die Fähigkeit der verschiedenen exprimierten Genprodukte, NF- κ B zu aktivieren, führt zu einer Aufrechterhaltung des Aktivierungsstatus von NF- κ B. Die Induktion der zellulären iNOS führt zum Anstieg der NO-Konzentration. NO wird in zytotoxische Derivate wie Peroxynitrit umgewandelt. Die hohe Konzentration von Peroxynitrit führt dann zur DNA-Schädigung, was wiederum eine exzessive Aktivierung der PARP zur Folge hat. Die Überaktivierung der PARP bewirkt eine Entfernung der Zellenergie, die dann in Entstehung von mitochondrialen freien Radikalen und Nekrose resultiert. Diese schließlich kann zu Inflammation, Fehlfunktionen oder Neurodegeneration führen (Chiarugi & Moskowitz 2003, Cuzzocrea et al. 2002, Hassa et al. 2001, Hassa & Hottiger 2002, Mattson & Camondola 2001).

1.5.3 Cholesterolverstoffwechsel im ZNS

Das Zentrale Nervensystem macht nur 2 % der gesamten Körpermasse aus, aber es beinhaltet nahezu ein Viertel des ganzen Cholesterols des Körpers. Es ist zum einen anzufinden in der Plasmamembran von Gliazellen und Neuronen und zum anderen in den speziellen Membranen des Myelin. Während des Wachstums des Gehirns und bei Neuronenremodellierung kommt es zu einem starken Turnover von Cholesterol innerhalb der Gliazellen und Neuronen (Dietschy and Turley 2001, Bjorkhem and Meaney et al. 2004). Aufgenommen wird es fast ausschließlich aus der *Situ*-Synthese, da die Blut-Hirn-Schranke vor dem Austausch von Cholesterollipoproteinen mit dem Kreislauf schützt (Bjorkhem and Meaney et al. 2004, Jurevics and Morell 1995, Michikawa 2003).

Der Fettstoffwechsel ist involviert in pathologische Prozesse, die im Zusammenhang mit Zellen des zentralen Nervensystems stehen (Chang and Liu 1998). Cholesterol aus dem Plasma wird hier eine wichtige Rolle als biologischer Marker für die Krankheitsaktivität nach Demyelinisierungsprozessen zugeordnet. Da Multiple Sklerose charakterisiert ist durch die Zerstörung von Myelin, kommt es dadurch zu einer deutlichen Veränderung des Myelincholesterols und des Fettstoffwechsel im ZNS (Giubilei et al. 2002). Während der Regeneration von peripheren Nerven ist allerdings die Cholesterolsynthese in den Nerven herunterreguliert. Statt dessen wird das Cholesterol von degenerierten Nerven und Myelin vermutlich zurückbehalten und hier über ein Lipidprotein vermittelten Prozess wiederverwendet (Posse de Chaves et al. 2000).

An dem internen Sterolrecycling sind Liganden wie Apolipoprotein E und AI und mehr oder weniger Membrantransportproteine wie Low-Density-Lipoprotein (LDL) aus der Rezeptorfamilie beteiligt (Dietschy and Turley 2001). Lipoproteine sind makromolekulare Komplexe, die sich aus Lipiden und Proteinen zusammensetzen und die den Organismus mit Fetten versorgen. Sie sind in die Biosynthese von Membranen involviert, aber beteiligen sich auch an Signalwegen und antioxidativen Mechanismen und konnten ebenfalls im Liquor nachgewiesen werden (Danik et al. 1999). Die Lipide und Proteine von humanen LDL und HDL (high density lipoprotein) werden von distalen Axonen aufgenommen und zum Zellkörper transportiert. Die Zellkörper und die proximalen Axone verwerten jedoch nur die Proteine und Lipide aus den LDLs (Posse de Chaves et al. 2000). Nach Schädigung von peripheren Nerven konnte eine stark erhöhte Synthese von apoE durch Makrophagen und apoE-Akkumulation nachgewiesen werden. Das bestätigt, dass dieses Protein an der axonalen Regeneration und Myelinproduktion beteiligt ist (Beffert et al. 1998, Posse de Chaves et al. 2000, Pritchard et al. 2003). Die Rezeptoren, die an der Aufnahme von Lipoproteinen in Axone und Schwannzellen involviert sind, sind noch nicht vollständig charakterisiert. Auch die Aufnahme und Verwertung von Lipiden aus den Lipoprotein für die Axonregenerierung konnte nicht direkt nachgewiesen werden (Posse de Chaves et al. 2000). Rezeptoren, die hierfür in Frage kämen, wären zum Beispiel der LDLR (low density lipoprotein receptor), der LRP (LDLR-related protein) – ein multifunktioneller apoE-Rezeptor - LR11 (SorLA) und LR7/8B (apoER2) (Hayashi et al. 2004, Posse de Chaves et al. 2000).

LDLs wird außerdem eine Beteiligung an der Formation von Arterioskleroseläsion und die Induktion von Zelltod in verschiedenen Zelltypen zugewiesen (Lizard et al. 1997). Es wird diskutiert, dass LDLs oxidativ zu oxLDL modifiziert werden müssen, um die entsprechenden pathologischen Ereignisse auszulösen, wie zum Beispiel das Auslösen und Fortschreiten von Arteriosklerose (Chang and Liu 1998, Zhou et al. 2000). Hierfür sind Makrophagen beschrieben, welche fähig sind, die LDLs zu oxidieren und oxLDL's aufzunehmen, was dann zu einer Akkumulation von Cholesterol und

Oxysterolen führt (Maor et al. 2000). So konnte ein Anstieg von oxLDL bei Patienten mit chronischer Arterienerkrankung und bei Patienten, die sich einer Herztransplantation unterzogen hatten, nachgewiesen werden (Zhou et al. 2000). In vaskulären Endothelzellen bewirken oxLDL eine Schädigung der Zellmembran, Vitalitätsverlust, gehemmte Wundheilung sowie einen erhöhten Ca^{2+} -Gehalt im Zytosol (Ide & Lau 1997, Murugesan et al. 1993, Zhou et al. 2000). Calcium spielt hier eine wichtige Rolle während des nekrotischen und apoptotischen Zelltodes (Chang et al. 1998a). Dabei wurde gezeigt, dass Lipidoxidation an Membranen den transmembranen Calciumtransport verändert (Chang et al. 1998b). OxLDLs und Cholesteroloxide wirken so auf eine Vielzahl von Zellen toxisch, einschließlich Makrophagen (Chang et al. 1998c).

Auch die HDLs kommen im Gehirn vor und sind sehr empfindlich gegenüber oxidativen Modifikationen (Keller et al. 2000). Astrozyten und Mikroglia spielen eine entscheidende Rolle bei oxidativem Stress und Neuronensterben unter neurodegenerativen Bedingungen. Sie gelten als primäre Quelle der HDL und auf Grund der Reaktionen nach oxidativem Stress gelten die Gliazellen zusätzlich als Quelle für oxidierte HDL (oxHDL) (El Khoury et al. 1998, Keller et al. 2000, Schipper et al. 1995). HDLs enthalten Apolipoproteine E und A-I (Kivatinitz et al. 1997). OxHDL induzieren in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia oxidativen Stress, wirken aber nur auf die Neuronen toxisch (Keller et al. 2000). Desorganisation von Mikrotubuli, Aggregation von Zellen und Fragmentierung von Neuriten sind charakteristische Formen der Neurodegeneration, die durch HDLs hervorgerufen werden (Kivatinitz et al. 1997).

1.5.4 Wirkung und Vorkommen von Oxysterolen

Während der Oxidation von Low-Density-Lipoproteinen kommt es zur Bildung von Oxysterolen (Cholesteroloxide) (Hamilton et al. 2001). Diese sind aber auch Produkte des Cholesterolkatabolismus in Tieren und kommen in Speisen wie Milchpulver, Käse- und Eierprodukten vor (Chang and Liu 1998). Verschieden Cholesteroloxydationsprodukte spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Arteriosklerose (Sevanian et al. 1994). So wurde gezeigt, dass exogen gegebene Oxysterole relativ schnell aus dem Plasma entfernt und über den gesamten Körper verteilt werden können (Chang and Liu 1998). Sie präsentieren eine Klasse von potenziellen regulatorischen Molekülen mit verschiedenen wichtigen Funktionen. Sie erhöhen den Ca^{2+} -Einfluss, beeinflussen die Membranpermeabilität und -stabilität, reduzieren in vielen Zellen die Cholesterolsynthese, inhibieren die DNA-Synthese, haben Einfluss auf Transkriptionsfaktoren und die Kernrezeptoren, erhöhen die Zellschäden und können den programmierten Zelltod induzieren (Björkhem 2002, Geng & Libby 2002, Schroepfer 2000, Zhou et al. 2000). Des Weiteren induzieren Cholesteroloxide eine exzessive Akkumulation von Lipiden in Zellen, was den normalen

Zellstoffwechsel und die Homeostase stören kann. Exogen zugebene Cholesteroloxide können in die Zellmembran eingebaut werden und diese dadurch verdichten (Chang and Liu 1998). Für Amyloid Betapeptid, welches als auslösendes Agens für die Alzheimer-Krankheit diskutiert wird, konnte gezeigt werden, dass es die Fluidität der Plasmamembran verändert und so zur Lipidperoxidation führt. Dies wird auch in Fall der Oxysterole vermutet (Chang et al. 1998a). Weiterhin gibt es Nachweise dafür, dass Cholesteroloxide das intrazelluläre Zytoskelett stören, wie es zum Beispiel auch für Vimentin und Actin nachgewiesen werden konnte (Chang and Liu 1998).

Die Zytotoxizität von Oxysterolen konnte in einer Vielzahl von Zellen nachgewiesen werden, wie zum Beispiel in vaskulären Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur und Fibroblasten (Chang and Liu 1998, Moreira et al. 2001, Szedlacsek et al. 1995, Zhou et al. 2000). Daneben wirken sie toxisch auf Zellen des Immunsystems wie Thymozyten, Lymphozyten, Makrophagen und T-Zellen (Bischoff et al. 2000, Chang and Liu 1998, Chang et al. 1998a) und sind möglicherweise an der Aktivierung von Mikroglia beteiligt (Chang et al. 1998c). Studien an Neuronen und Gliazellen des ZNS haben gezeigt, dass diese Enzyme enthalten, welche Cholesteroloxide in eine Vielzahl von Metaboliten umwandeln können (Chang and Liu 1998).

Eine erhöhte Konzentration von regulatorischen Oxysterolen korreliert mit der Unterdrückung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), einem Schlüsselenzym der endogenen Biosynthese von Cholesterol, was wiederum korreliert mit der schon erwähnten Herunterregulierung der Cholesterolsynthese während der Regeneration von peripheren Nerven (Axelson & Larsson 1995, Chang and Liu 1998, Saucier et al. 1989, Szedlacsek et al. 1995). Oxysterole binden an einen intrazellulären Rezeptor, wie dem Oxysterol-Bindeprotein und werden dann zum Golgi-Apparat transportiert (Dyer et al. 1997). Des Weiteren aktivieren Oxysterole die Acyl-CoA-Acyltransferase und inhibieren die Bindung von LDL durch Minimierung der LDL-Bindestellen (Szedlacsek et al. 1995, Zhou et al. 2000). Cholesterol ist bekanntlich eine integrale Komponente der Zellmembran. Durch die große Membranoberfläche der Axone neuronaler Zellen und der Dendriten ist es möglich, dass die Inhibierung der Cholesterolsynthese teilweise verantwortlich sein könnte für die Neurotoxizität von Oxysterolen (Chang and Liu 1998, Chang 1998a).

1.5.4.1 Bedeutung von 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol

Durch Autooxidation von Cholesterol entsteht 7-Ketocholesterol, ein spezifischer Indikator für die durch freie Radikale vermittelte Oxidation von Lipoproteincholesterol (Dyer et al. 1997, Schroepfer 2000). Es wurde gezeigt, dass 7-Ketocholesterol nach Kainate-induzierter Schädigung in hippokampalen Schnittkulturen unter anderem verantwortlich ist für gravierende oxidative Schäden

an Neuronen (Ong et al. 2003). Cholesteroxide haben eine Menge zytotoxische Effekte und unter den am C7 oxidierten ist 7-Ketocholesterol ein potenzieller Auslöser für den Zelltod durch die Induktion von Apoptose und gesteigerte Produktion von Superoxidanionen (Lizard et al. 1997, Miguët-Alfonsi et al. 2002, Zahm et al. 2003). Es gibt Studien, die zeigen, dass Synapsen, granuläre Zellen aus dem Gehirn und Mitochondrien unter oxidativem Stress Cholesteroxide bilden können, wobei 7-Keto- und 7-Hydroxycholesterol die herausragendsten sind (Chang and Liu 1998). In humanen vaskulären Endothelzellen (HUVEC) löste 7-Ketocholesterol eine Verminderung der adhärennten Zellen und eine Zunahme von nicht adhärennten Zellen aus. In den 7-Ketocholesterol behandelten Zellen kam es zu einer internukleären DNA-Fragmentierung und die apoptotische Zellen waren vorwiegend unter den nicht adhärennten Zellen zu finden (Lizard et al. 1997). Ultrastrukturelle Unterschiede in 7-Ketocholesterol-behandelten HUVEC und BAEC (Bovine Aortic Endothelial Cells) sind sich sehr ähnlich und charakterisiert durch kondensierte Chromatine, veränderte Mitochondrien, gestörte Zytoskelettorganisation und Vakuolen, die Myelinstrukturen und Zelltrümmer enthalten (Lizard et al. 1997).

25-Hydroxycholesterol (25H) hat eine regulatorische Funktion in der Cholesterolumhomöostase. Im Blut und Gewebe kommt dieses Oxysterol jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen vor (Schroepfer 2000). In verschiedenen Arbeiten von Chang et al. wurde die Toxizität von 25-Hydroxycholesterol untersucht. So wurde in symphatischen Neuronen aus Ratten gezeigt, dass auch dieses Oxysterol den Zelltod bewirken kann. Bei einer Vielzahl von Zellen konnte gezeigt werden, dass es die Permeabilität dieser verändert und somit eine erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme bewirkt. Eine Ausnahme machten jedoch PC12-Zellen und symphatischen Neuronen. Hier konnte nach Zugabe von 25-Hydroxycholesterol kein signifikanter Ca^{2+} -Einfluss beobachtet werden. Zusätzlich konnte in N9 Mikrogliazellen gezeigt werden, dass die LPS-induzierte NO-Produktion durch 25-Hydroxycholesterol erhöht wird, was nachfolgend zum Zelltod führt. Unter den getesteten Oxysterolen zeigte sich dieses am toxischsten (Chang et al. 1998a, Chang et al. 1998b, Chang et al. 1998c).

1.6 Zielstellung

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen des Liquors von Multiple-Sklerose-Patienten durchgeführt. Hierbei konnten mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie erstmalig verschiedene Oxysterole detektiert werden, wobei sich die Oxysterole 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol als besonders herausragend zeigten. Aufbauend auf diese Vorbefunde sollte dies nun durch weitere Untersuchungen von Patienten-Proben und Untersuchungen am

Tiermodell weiter bestätigt werden und außerdem untersucht werden, inwieweit sich besonders 7-Ketocholesterol auf die Interaktion von Neuronen und Mikroglia auswirkt, welche mikroglialen Schädigungsprodukte und Signalwege hierbei eine Rolle spielen. Es stand dafür ein breites Spektrum von biochemisch-analytischen und proteinbiochemischen Methoden sowie Methoden zur Zellkultur zur Verfügung. Es sollte hierbei der Schwerpunkt auf folgende Fragen gelegt werden:

1. Setzen Neuronen nach oxidativer Schädigung 7-Ketocholesterol frei und welche Rolle spielen Mikroglia hierbei?

In diesen Untersuchungen sollte eine quantitative Klärung mittels HPLC-Analyse der Freisetzung von 7-Ketocholesterol durch Neuronen erfolgen. Es sollte weiter festgestellt werden, ob diese 7-Ketocholesterol abbauen können und wie Mikroglia am Abbau und der Freisetzung dieses Oxysterols beteiligt sind. Gleichzeitig sollte die Bedeutung von Oxysterolen auf inflammatorische Nervenzellschädigung mittels Slicekulturexperiment untersucht werden.

2. Wird 7-Ketocholesterol auch im Gehirn von Multiple Sklerose Patienten und im ZNS von EAE-Mäusen freigesetzt und gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen?

Auch hier sollte eine quantitative Bestimmung des 7-Ketocholesterolgehaltes mittels HPLC-Analyse in den einzelnen Krankheitsstadien und ZNS-Regionen erhoben werden.

3. Welche Signalstoffe werden in Mikroglia durch 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol ausgeschüttet?

Als für die Untersuchung relevante Signalstoffe wurden vor allem solche in Erwägung gezogen, die besonders herausragend in Bezug auf neurodegenerative Krankheiten und oxidative Schädigung sind. Dafür sollte eine quantitative und zeitliche Untersuchung von Zytokinen und reaktiven Stickstoffspezien erfolgen.

4. Welche Signalwege sind von 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol betroffen?

Für die mikrogliale Aktivierung durch 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol sollte zunächst die Beteiligung der nukleären schädigungsinduzierbaren Signalwege wie das Poly(ADP-Ribose)Polymerase System untersucht werden. Dieses ist besonders anfällig für oxidativ modifizierte Makromoleküle und kann so eine Stressantwort in Mikrogliazellen hervorrufen. Anschließend daran sollte die Beteiligung verschiedener stressrelevanter MAP-Kinasen untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acetonitril	Roth
Acrylamid (37,5:1 Acryl/Bis-Acrylamid)	Fluka
Agarose	Biozym
APS (Amoniumpersulfat)	Serva
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
BHT (Butylated hydroxytoluene)	Sigma
Blottpapier	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
Chloroform	Roth
Cholesterol	Sigma
Coomassie Blue (R250)	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) steril	Gibco
ECL (elektrogenerated chemiluminescence) - Detektion-Kit	Amersham
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma
EGTA (Ethylenglycol-bis(b-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraacetat	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol 96%	Merck
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom
Fettstift	DAKO Diagnostiks
Glucose	Sigma
Glutamat	Sigma
L-Glutamin	Gibco
Glutaraldehyd	Serva
β-Glycerolphosphat	Sigma
Glycerin	Sigma
Glycin	Sigma
Griess-Reagenz	Fluka
HBSS (Hanks' balanced salt solution)	Gibco
HCl (Salzsäure)	Roth

Hepes	Sigma
Herings DANN	Sigma
HS (Horse Serum)	Biochrom
25-Hydroxycholesterol	Sigma
Hyperfilm ECL	Amersham
Immu-Mount	Shandon/Pittsburg
Insulin	Gibco
Isopropanol (Analyse)	Roth
Isopropanol (HPLC)	Roth
KCl (Kaliumchlorid)	Fluka
7-Ketocholesterol	Sigma
Leupeptin	Sigma
LPS (Lipopolysaccharid; E.coli Seroty: 0111:B4)	Sigma
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Fluka
Marker (Prestained Protein Marker, Broad Range)	New Engl Bio Lab
Marker	Cell Signaling
MEM (minimum essential medium) 25mM Hepes	Gibco
β-Mercaptoethanol	Fluka
Methanol (Analyse)	Roth
Methanol (HPLC)	Roth
Milchpulver	Roth
Milipore H ₂ O	selbst hergestellt
MTT	Sigma
Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat)	Sigma
NaCl (Natriumchlorid)	Sigma
NaOH (Natriumhydroxid)	Sigma
Na ₂ NO ₂ (Natriumnitrit)	Sigma
Na ₃ VO ₄ (Natriumorthovanadat)	Sigma
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Sigma
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O/ ~ x H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat)	Sigma
Natriumpyrophosphat	Sigma
NAD ⁺ (Nicotinsäureadenindinukleotid)	Sigma
³² P-NAD ⁺	NEN
Nitrocellulose-Membran 0,45µm	Schleicher & Schuell
N-methyl-D-aspartat (NMDA)	Sigma

Nonidet P40	Sigma
Normalserum	Gibco
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
PBS (Phosphate-buffered saline)	Sigma
Pikrinsäure	Roth
PMSF (Phenylmethanolsulfonylfluorid)	Sigma
Poly-D-Lysin	Sigma
H ₂ PO ₄ (Phosphorsäure)	Merck
Rekombinate PARP-1	Alexis
Saccharose	Sigma
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)	Sigma
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma
TCA (Trichloressigsäure)	Roth
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma
Tris (Base)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin	Boehringer
Tween20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Roth
Vitamin C	Sigma
Wasser (HPLC)	Roth
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Sigma
Zinkchlorid	Sigma

2.2 Antikörper

Avidin/biotinylated enzyme complex technique	ABC-Elite, Vektor Laboratories
α-creb	Cell signalling
α-caspase 3	Sigma
α-p-creb	Cell signaling
α-Elk-1	Cell signaling
α-p-Ekl-1	Cell signaling
α-Erk1/2	Cell signaling/Sigma

α -p-Erk1/2	Cell signaling
IB ₄ (FITC)	Sigma
α -Mek1/2	Cell signaling
α -p-Mek1/2	Cell signaling
NeuN (Neuronal nuclear protein) (mouse anti-mouse)	Chemicon
Neurofilament (mouse anti-mouse)	Chemicon
α -p38	Cell signaling
α -p-p38	Cell signaling
α -SAPK/JNK	Cell signaling
α -p-SAPK/JNK	Cell signaling
α -NF- κ B(p65)	Sigma
α -mouse	Amersham
α -rabbit	Amersham
ELISA Kit TNF- α	BD Pharmingen
ELISA Kit IL-6	BD Pharmingen
ELISA Kit IL-1 β	BD Pharmingen
ELISA Kit IL-10	BD Pharmingen
ELISA Kit MCP-1	BD Pharmingen

2.3 Geräte

Binokular (Mikroskop)	Olympus
Brenner	
Brutschrank für 37°C Inkubationen	Hereus Instruments
Brutschrank für 35°C Inkubationen	Hereus Instruments
Digitale Kamera (Software: SensiCam 3.0)	Olympus
Dioden-Array-Detektor	Pharmacia LKB VWM
2141 UV Detektor	
Dounce-Homogenisator, Sonoplus GM70	Bandelin
Elektrophorese- und Blottingappatur	Bio-Rad
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop, BX50	Olympus
HPLC	Hewlett-Packard 1050
	HPLC-System mit
Jung Kryostat 2800 Figocut-E	Cambridge Instruments
Kühlzentrifuge, 5417R	Eppendorf

Kühlzentrifuge, Rotina 35R	Hettich
Mikrowelle	Moulinex
Photometer, Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Plattenreader (ELX 800)	Biotech Instruments
pH-Meter (pH 537)	WTW
Reversed Phase Säule C-18	Supelco
Länge 25cm, Durchmesser 46mm,	
Guard column: 5cm, Partikelgröße 5µL	
Schüttler	Eppendorf
Szinillationszähler, LS 6500	Beckmann
Tischzentrifuge, Biofuge Pico	Heraeus Instruments
Vibratom	Technical Products
	International / Shandon
Wasserbad	GFL
Zellzentrifuge	MLW

2.4 Material

6-Well-Platten (steril)	Falcon
96-Well-Platten (flach, steril)	Nunc
96-Well-Platten (immuno)	Nunc
Flacons T75 (steril)	Falcon
Insulinspritze (mit Kanüle) 1mL	Omnifix
Pasteurpipette	Brand
Petrischalen	Falcon
Präparierbesteck	Aeskulap
Röhrchen (50mL, 15mL)	Falcon
Zellkultureinsätze (steril)	Biochrom
Zellschaber	Nunc

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die Kultivierung von Zellen gilt als etablierte Methode, bei der biochemische Untersuchungen unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt werden können. Allerdings gelten die an Zellkulturen gewonnen Ergebnisse nur in begrenztem Ausmaß auch für natürliches Gewebe.

3.1.1 BV-2-Mikrogliazellen

BV-2 sind immortalisierte Mauszellen, hergestellt aus einer primären Mikrogliazelllinie, welche mit einem *v-raf/v-myc*-onkogentragenden Retrovirus J2 infiziert wurden. Diese Zellen entsprechen in ihren morphologischen, phenotypischen und funktionellen Eigenschaften frisch isolierten Mikrogliazellen und haben die meisten immunologischen Eigenschaften, die aktiven Mikroglia zugeschrieben werden, beibehalten (Blasi et al., 1990). Sie dienen deshalb als praktisches Modell zur Untersuchung der Aktivierung von Mikroglia und für Studien von molekularen Mechanismen (Blasi et al. 1990; Laurenzi et al. 2002). Beim Menschen sind Mikrogliazellen in pathologische Prozesse des ZNS, wie z. B. Ischämie, Traumata, demyelinisierenden Krankheiten, HIV-Infektionen und anderen neurodegenerativen Krankheiten, involviert (Blasi et al. 1990; Woo et al. 2003). Mikroglia weisen bei Verletzungen des Gehirns eine erhöhte Aktivität auf. Das erkennt man an morphologischen Veränderungen, einer erhöhten MHC-II-Expression, der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und einer gesteigerten Phagozytose-Aktivität (Shafer et al. 2002; Woo et al. 2003).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 3,7 g/L NaHCO₃ und 4,5 g/L Glucose bei 37 °C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Dem Medium wurden 10 % hitzeinaktiviertes FCS („fetal calve serum“ - Fetales Kälberserum), 1 % L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin zugesetzt. Zur Weiterkultivierung wurden die adhärent wachsenden Zellen, sobald sie konfluent erschienen, geschabt und mit frischem Medium zu einer Zelldichte von maximal 2 x 10⁵ Zellen/mL verdünnt und neu ausgesät.

3.1.2 HT22 Neuronen

HT22 ist eine neuronale Zelllinie, die sensitiv auf Glutamat reagieren kann. Es handelt sich hierbei um einen nach seiner Glutamat-Sensitivität ausgewählten Subklon der immortalisierten

hippokampalen Mauszelllinie HT-4 (Davis and Maher 1994, Stanciu et al. 2000). HT22 besitzen keinen ionotropen Glutamat-Rezeptor. Die Glutamatzytotoxizität wird daher über einen nicht rezeptorvermittelten, oxidativen Mechanismus ausgelöst. Dabei bewirkt das Glutamat ein Absinken der Glutathionkonzentration und einen damit einhergehenden Anstieg des H_2O_2 -Gehaltes (Davis and Maher 1994, Maher and Davis 1996). Zellen benutzen normalerweise die Glutathionperoxidase um H_2O_2 zu entfernen, aber der Zusatz von Glutamat führt zum Ausbleiben der Glutathionsynthese und fördert so die Störung der Neutralisierung von H_2O_2 über die Glutathion-Peroxidase (Murphy et al. 1989).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 3,7 g/L NaHCO_3 und 4,5 g/L Glucose bei 37 °C und einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre. Dem Medium wurden 10 % hitzeinaktiviertes FCS (fetal calve serum), 1% L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin und 8,5 g/L Glucose zugesetzt. Zur Weiterkultivierung wurden die adhärent wachsenden Zellen, sobald sie konfluent erschienen, geschabt, mit frischem Medium zu einer Zelldichte von maximal 2×10^5 Zellen/mL verdünnt und neu ausgesät.

3.1.3 Präparation und Kultivierung organotypischer hippocampaler Schnittkulturen (OHSK)

Organotypische hippocampale Schnittkulturen werden als gutes *in vitro* Modell für Untersuchungen neuronaler Wechselwirkung zwischen Gyrus Dentatus und Hippokampus betrachtet, sofern die inneren Verbindungen der hippocampalen Formation intakt bleiben (Frotscher et al. 1995). Sie bewahren weitestgehend die morphologischen und physiologischen Eigenschaften einer *in vivo* Situation (Hailer et al. 1996).

Die organotypischen hippocampalen Schnittkulturen wurden aus Hirnen 9-10 Tage alter Mäuse und nach einer Methode von Hailer et al. (1996) präpariert. Die Mäuse wurden dekaptiert und die Hirne unter sterilen Bedingungen entnommen. Von diesen Hirnen wurde nach rostral vom restlichen Neokortex und nach kaudal vom Hirnstamm und Kleinhirn, der Hippokampus und der entorhinale Kortex abpräpariert. Dieser sterile Schnitt wurde dann in eiskaltes Präparationsmedium überführt. Das Präparationsmedium enthielt HBSS (Hanks balanced salt solution) und 10 % FCS. Das Hirngewebe wurde dann auf einen Sektionsblock geklebt und mit dem Vibratom in 350 μm dicke Koronarschnitte geschnitten. Es wurde dabei beachtet, dass Sektionsblock und Hirngewebe mit Präparationsmedium bedeckt waren. Danach wurden die Schnitte mit einer Pasteurpipette in Petrischalen mit eiskaltem Präparationsmedium überführt. Darin wurden diese unter dem Binokular dann so zurechtgeschnitten, dass sie nur noch aus Hippokampus und enthorinalen

Kortex bestanden. Es erfolgte dann der Transfer von jeweils drei bis vier Schnitten auf eine Filtermembran mit einer Porengröße von 0,1 µm, welche wiederum in die Vertiefung einer 6-Well-Kulturschale kamen. In diesem befand sich ein auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium mit pH 7,4, welches sich aus MEM (minimum essential medium) und HBSS im Verhältnis 2:1, 25 % Normales Pferdeserum, 2 % L-Glutamin, 2,64 mg/mL Glucose, 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 1 µg/mL Insulin, 0,8 µg/mL Vitamin C, 5 mM Tris-Base und 0,044 % Natriumbikarbonat zusammensetzte. Das Kulturmedium hatte nur von unten direkten Kontakt mit dem hippokampalen Gewebe. Die Kultivierung erfolgte nun bei 35 °C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre für 9-10 Tage, um *in vitro* eine gesunde organotypische Umgebung innerhalb der mittleren Schichten des Schnittes sicherzustellen. Diese ist notwendig um mikrogliale Ramifizierung zu induzieren (Hailer et al. 1996). Einen Tag nach der Präparation erfolgte ein Mediumwechsel, welcher anschließend jeden zweiten Tag bis zur Verwendung der Schnitte wiederholt wurde.

3.1.4 Induktion der exitotoxischen Schädigung mit NMDA und Transfer der Mikrogliazellen auf die Schnittkulturen

Neun Tage nach dem Anlegen der Schnittkulturen wurden auf diese, die Kontrolle ausgenommen, 10⁵ Mikrogliazellen (in 5 µL) gebracht. Bei vorausgehender exzitotoxischen Schädigung mit NMDA (N-methyl-D-aspartat) wurde dieses zuvor in einer Konzentration von 50 µM für 24 Stunden auf die Schnitte gegeben. NMDA ist ein NMDA-Rezeptor Agonist und löst eine neuronale Zellschädigung (Primärschaden) durch die Überaktivierung exzitatorischer Aminosäurerezeptoren aus. Bei diesen Aminosäurerezeptoren handelt es sich um ionotrope Glutamaterezeptoren.

3.1.5 Präparation primärer Neuronen

Nervenzellen aus Primärkulturen können *in vitro* gehalten werden. Allerdings können sie sich, selbst wenn sie aus embryonalem Gewebe stammen, wo *in vivo* durchaus noch Nervenzellteilungen möglich sind, nicht mehr vermehren. Man kann jedoch *in vitro* bestimmte Differenzierungsprozesse wie die Bildung von Ausläufern noch beobachten. Die Primärkultur ermöglicht es bestimmte physiologische Vorgänge, die nervenzellspezifisch sind, zu beobachten (Lindl 2002).

Für die Präparation primärer Neuronen wurde eine schwangere Maus (E15-E17, terminiert verpaart) durch Genickbruch getötet. Danach wurde der Maus der Bauchraum geöffnet und der Uterus mit den Embryonen entnommen und diese in auf 4 °C gekühltes HBSS (+Ca/Mg) gelegt. Als nächstes wurde der Embryo freigelegt, der Kopf abgeschnitten und in einer Petrischale unter das Mikroskop gelegt. Der Schädel wurde entlang der Fontanelle von hinten nach vorne mit einer

Feinschere aufgetrennt, das Gehirn entnommen, das Kleinhirn abgetrennt und der Hypothalamus entfernt. Danach wurden die Hirnhälften getrennt und die Menigen entfernt. Die beiden Großhirnhälften wurden in ein Bluecap überführt und dreimal mit sterilem HBSS (w/o Ca/Mg) gespült. Nach dem letzten Spülen wurde auf 4,5 mL Puffer reduziert und 0,5 mL Trypsin 2,5%iger Konzentration zugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 0,25 % ergab und für 10-12 Minuten im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte eine Neutralisierung des Trypsins mit 0,5mL FCS. Der Überstand wurde abgesaugt und danach noch 2-3mal mit HBSS (Ca/Mg) gespült. Falls die Hirne agglomerierten, wurde ein 100 µL Aliquot DNase dazugegeben und dies dann leicht geschwenkt, bis sie vereinzelt waren. Der Überstand wurde dann wieder abgesaugt und 3-4mL Neurobasal Medium hinzugegeben. Das Volumen wurde dann bis auf den Konus reduziert. Eine Pasteurpipette wurde über dem Brenner feuerpoliert, bis die Kante rund war. Mit einer kräftigen Saughilfe wurde zuerst die Wand der Pipette mit Medium benetzt und dann das Gewebe zwei- bis dreimal grob eingesaugt. Danach ließ man das homogenierte Gewebe wieder absinken. Die Kapillare wurde am Boden angesetzt und das Ganze trituriert, bis ein Homogenisat entstand. Die gesamte Suspension wurde, auf mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Platten verteilt, ausplattiert (ca. 4 Großhirne auf 5 Platten). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Wenn die Zellen konfluent erschienen, wurden die adhären wachsenden Mikrogliazellen mechanisch abgelöst und die weitere Proliferation der verbleibenden Gliazellen mit 8 µM Cytosin Arabinosid inhibiert. Nach drei Tagen konnten die Zellen weiterverwendet werden.

Zur Beschichtung der Platten mit Poly-D-Lysin wurde 1 mg/mL Aliquot auf 20-50 µg/mL verdünnt und die Platten über Nacht bei Raumtemperatur damit inkubiert. Kurz vor der Präparation wurde das Poly-D-Lysin von den Platten abgezogen und diese zweimal mit sterilem Wasser gespült und unter der Sterilbank luftgetrocknet.

3.2 Bestimmung der 7-Ketocholesterolkonzentrationen

3.2.1 Extraktion der Cholesterole

Die Extraktion von 7-Ketocholesterol erfolgte nach Sevanian et al. (1994). Die Proben wurden in 2 mL PBS/0,01 % BHT aufgenommen und im Verhältnis 1:3 mit 6mL eines Chloroform-Methanol-Gemisches (2:1 v/v)/0,01 % BHT gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 10 Minuten Zentrifugieren mit 3000 rpm bei 4 °C wurden 2 mL von der Unterphase abgenommen und das Lösungsmittel mit Stickstoff verblasen. Das trockene Pellet wurde dann in 300 µL eines Acetonitril-Chloroform-Gemisches (1:1 v/v)/0,01 % BHT aufgenommen.

3.2.2 Messung von 7-Ketocholesterol mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die Konzentration von 7-Ketocholesterol (**Abbildung 3-1**) wurde mittels der hochauflösenden Flüssigchromatographie bestimmt. Es wurde eine Reversed-Phase-C-18-Säule und ein isokratisches Lösungsmittelsystem von Acetonitril-Isopropanol-Wasser (44:54:2 v/v/v) verwendet (Kritharides et al. 1993). Von dem fertigen Extrakt (s. 3.2.1) wurden 20 µL injiziert. Bei einer Laufgeschwindigkeit von 1 mL/min lag die Retentionszeit von 7-Ketocholesterol bei 56 Minuten. 7-Ketocholesterol konnte bei einer Wellenlänge von 234 nm gemessen werden.

Für eine Eichkurve wurden Standards von 7-Ketocholesterol im Bereich von 0-150 µg/mL in dem gleichen Acetonitril/Chloroform-Gemisch, in dem die Proben aufgenommen wurden, angesetzt.

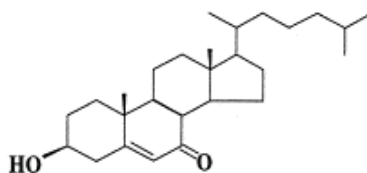


Abb. 3-1: 7-Ketocholesterol (3β-Hydroxycholest-5-ene-7-one)

3.3 Bestimmung des NO-Gehaltes

Stickstoffmonoxid (NO) wurde in Form von Nitrit (NO₂) mit dem Griess-Reagenz bestimmt, wie bei Green et al. (1982) beschrieben. Die Griess-Reaktion beruht auf der Umsetzung des Griess-Reagenz (0,05 % *N*-1-Naphthyl-Ethylene-Diamine-Dihydrochloride/0,5 % Sulfanilamid/2,5 % Phosphorsäure) mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff (**Abbildung 3-3**), der bei einer Messwellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen wird. NO wird einer Zahl von Reaktionen unter biologischen Bedingungen unterzogen. Diese Reaktionen schließen die Bildung von Nitrat- und Nitrit-Ionen ein (**Abbildung 3-2**). Es werden also bei dieser Messung alle NO-Verbindungen mit einbezogen.

Zur Bestimmung des NO-Gehaltes wurden 100 µL Medium mit 100 µL Griess-Reagenz im 96-Wellformat gemischt und nach 10 Minuten bei den angegebenen Wellenlängen gemessen (Young et al. 2000). Als Standardkurve wurde Natriumnitrit (NaNO₂) in einer Konzentration von 2,5 µM bis 50 µM eingesetzt.

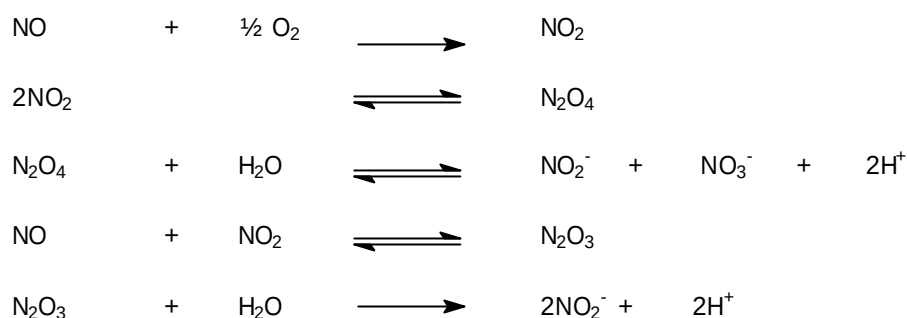
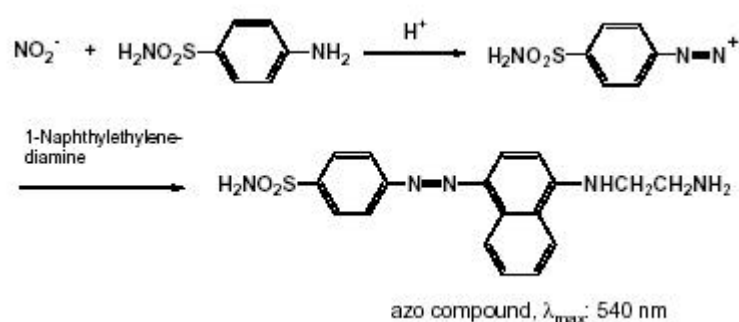


Abb. 3-2: NO-Reaktion und seine Metaboliten

Abb. 3-3: Farbreaktionsschema der NO_2^- -Detektion

3.4 Vitalitätsmessungen

3.4.1 MTT-Assay

Die Vitalitätsmessung mit dem Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist eine Methode, die nur die lebenden Zellen erfasst, jedoch nicht die toten, und deren Signalstärke zudem abhängig vom Aktivierungsgrad der Zellen ist. Hierbei entsteht durch Ringspaltung des wasserlöslichen, schwach gelben Tetrazoliumsalzes MTT das wasserunlösliche dunkelblaue Formazan. Da dieser Prozess von mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen katalysiert wird, werden bei diesem Assay auch nur diese erfasst. Das Formazan wird dann mit dem organischen Lösungsmittel Isopropanol wieder in Lösung gebracht. Diese Methode wird hauptsächlich zur Bestimmung der Zytotoxizität, Proliferationsrate oder Aktivierung verwendet (Mosmann 1983).

Das Assay wurde im 96-Well-Format durchgeführt. MTT wurde zu 5 mg/mL in PBS gelöst und sterilfiltriert. Die MTT-Stocklösung wurde auf alle Wells des Assays gegeben (10 μL auf 100 μL

Medium) und die Platten bei 37 °C für 4 h inkubiert. Saures Isopropanol (100 µL mit 0,1 N HCl in Isopropanol) wurde in jedes Well gegeben und gemischt, bis sich die dunkelblauen Kristalle gelöst hatten. Danach wurden die Platten bei einer Messwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm im Plattenreader gemessen (Mosmann 1983). Die Berechnung erfolgte als prozentualer Vergleich zur Kontrolle, welche meist aus unbehandelten Zellen bestand und 100 % gleichgesetzt wurde.

3.4.2 Trypanblaufärbung

Die Lebensfähigkeit von Zellen kann einfach und schnell mit der Trypanblaufärbung durchgeführt werden. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Die Trypanblaufärbung kann aber auch nur zur Zellzahlbestimmung genutzt werden.

Für die Zelltod-/Zellzahlbestimmungen wurden die Zellen mit dem Zellschaber vom Flakonboden gelöst, vorsichtig zusammen mit den Zellen im Medium homogenisiert und eine Probe mit Trypanblau (1:2 / 100 µL:100 µL) verdünnt. Die Zellzählungen nach Trypanblaufärbung wurden in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Ausgezählt wurden vier Großquadrate, bestehend aus je 16 Kleinquadraten. Der Mittelwert der vier Quadrate wurde gebildet und mit 2 (Verdünnungsfaktor) $\times 10^4$ multipliziert. Dies ergab die Zellzahl pro mL.

3.4.3 Zelltodbestimmung in den OHSKs mittels Färbung

3.4.3.1 Färbung der OHSKs mit Propidiumjodid

Drei Tage nach dem Transfer von Mikrogliazellen auf die Oberfläche der OHSKs (neuronale Schichten des Cornu ammonis [CA] und Gyrus dentatus [DG]) wurde die neuronale Schädigung in Anlehnung an Adamchik et al. (2000) mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. PI dringt sehr schnell in Zellen mit geschädigter Membran ein und wirkt stark fluoreszierend nach der Bindung an DNA. Dieses Reagenz ist selbst nicht toxisch gegenüber Neuronen und wird als Indikator für neuronale Membranintegrität und Vitalität benutzt (Newell et al. 1995). Für die Färbung wurde das PI in einer Konzentration von 5 µg/mL in das Kulturmedium unter die Membran, auf der die Hirnschnitte kultiviert worden waren, gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten im 37 °C Brutschrank. Jeder Zellkultureinsatz wurde daraufhin dreimal in frisches Kulturmedium getaucht, um den überflüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Zellkultureinsätze wurden dann in eine neue 6-Wellplatte mit frischem Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Hirnschnitte unter dem inversen Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop betrachtet und die kompletten, lebenden Schnitte

digital dokumentiert. Zuletzt wurden die Schnitte fixiert und gefriergeschnitten.

3.4.3.2 *Fixierung und Gefrierschneidung der OHSKs*

Die Quantifizierung des neuronalen Zelltodes erfolgte mittels Fixierung und Anfertigung von Kryostatschnitten nach Hailer et al. (1996). Zur Fixierung der Schnittkulturen wurde das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette vollständig aus den Zellkultureinsätzen entfernt. Dann wurden 2 mL Immunfixativ mit dem Zusatz von 0,1 % Glutaraldehyd in die Vertiefungen gegeben und die Schnitte 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach Entfernung des Immunfixatives wurden die Schnitte noch zweimal für je 10 Minuten auf dem Schüttler mit 0,1 M Phosphatpuffer (auf 1 L 21,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und 2,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) gewaschen. Anschließend wurde 2 mL Immunfixativ, dieses Mal ohne Glutaraldehyd, auf die Schnittkulturen gegeben und dieses dann für 2 Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur fixiert. Das Immunfixativ wurde wieder abgezogen, 0,1 M Phosphatpuffer auf die Schnitte gegeben und diese über Nacht auf dem Schüttler gewaschen. Am darauf folgenden Tagen wurden die Schnitte nochmals mit 0,1 M Phosphatpuffer für 30 Minuten gewaschen. Die Schnitte wurden nun in eine 0,8 M Saccharoselösung überführt. Bis zur Anfertigung der Kryostatschnitte wurden die Schnitte bei 4 °C aufbewahrt. Zur Herstellung des Immunfixatives wurden 40 g Paraformaldehyd in 350 mL bidestilliertem Wasser auf 75 °C erhitzt und NaOH tropfenweise hinzugegeben, bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurden 150 mL gesättigter Pikrinsäure und 500 mL 0,2 M Phosphatpuffer hinzugegeben.

3.4.3.3 *Spezielle Neuronen (NeuN) und Mikrogliafärbungen (IB₄)*

Neuronen konnten identifiziert werden durch eine doppelte Fluoreszenzfärbung gegen NeuN (neurales Kernprotein) (1:1000) und Neurofilamente (1:1000). Zur Färbung der Mikrogliazellen wurden die Gefrierschnitte mit *Griffonia simplicifolia* Isolectin B4 (IB₄)-FITC behandelt. Hierbei handelt es sich um ein pflanzliches Protein, welches mit hoher Affinität an spezifische Zuckerreste der Zellmembran, insbesondere der von Mikrogliazellen, bindet. Dadurch eignet sich diese Färbung auch besonders gut für die Untersuchung von Struktur, Bewegung und Proliferation der Zellen (Dailey und Waite 1999). Für die Färbung wurde IB₄⁺ 1:40 in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8) und 0,5 % Triton X-100 verdünnt und die Schnitte zunächst dreimal je 5 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen um die Einbettmittelreste des Gefrierschneidens zu entfernen. Anschließend wurden für 30 Minuten die unspezifischen Bindungen mit Pferdeserum (1:10 in 0,1 M Phosphatpuffer) blockiert und danach dreimal je 10 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. 20 µL des (IB₄)-FITC-

Antikörpern wurden auf die Schnitte gegeben und diese dann für 3 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Präparate wurden anschließend wieder dreimal für je 10 Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen, mit Immu-Mount eingedeckt und über Nacht im Dunkeln getrocknet. Am nächsten Tag konnten die Schnitte mittels Fluoreszenzmikroskop und FITC-Fluoreszenz, mit einem Anregungsfilter von 470-490 nm und einem Barrierefilter von 520-550 nm, untersucht werden.

3.4.3.4 *Analyse und statistische Auswertung der Neurodegeneration*

Pro Versuchsgruppe wurden 6 Schnitte angefertigt. Nach der Fixierung wurden dann jeweils 5 Gefrierschnitte gemacht, so dass sich am Ende eine Zahl von 30 zu untersuchenden Schnitten ergab. Die Ermittlung des neuronalen Zelltodes wurde im Hippokampus auf den Gyrus dentatus (DA) und das Cornu ammonis (CA) beschränkt. Die Schnitte wurden mit einem 20fach vergrößernden Objektiv untersucht und dokumentiert. Alle Aufnahmen wurden im Schwarz/Weiß-Modus erstellt und als Bitmaps gespeichert. Die Bilder wurden in Corel draw/Photopaint 9 in den RGB-Modus umgewandelt. Durch dieses Verfahren konnte die Anzahl toter neuronaler Zellen (PI⁺) toter Schnittkulturen ermittelt werden.

3.5 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die Bicinchoninic-Acid(BCA)-Methode verwendet. Dies ist ein sehr empfindlicher Proteinnachweis, bei welchem Peptidbindungen und die vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin von Bedeutung sind. Die Bildung von Cu(I)-Ionen durch Proteine unter alkalischen Bedingungen entspricht hierbei der Biuret-Bestimmungsmethode. Ein Cu(I)-Ion wird dabei durch zwei Moleküle BCA zu einem roten Chelat-Farbkomplex gebunden (**Abbildung 3-4**), welcher sehr empfindlich nachgewiesen werden kann (Smith et al. 1985, Wiechermann et al. 1988).

Das „Working Reagenz“ setzt sich aus 50 Volumenanteilen BCA-Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninic Acid und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) und einem Volumenanteil Kupfersulfat (CuSO₄) zusammen. Im 96-Well-Format wurden zu 25 µL Probe 200 µL fertiges, frisch angesetztes Reagenz gegeben und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Die Messung erfolgte am Plattenreader bei 562 nm. Eine Standardkurve wurde im Bereich von 25 µg/mL bis 1500 µg/mL aus BSA erstellt.

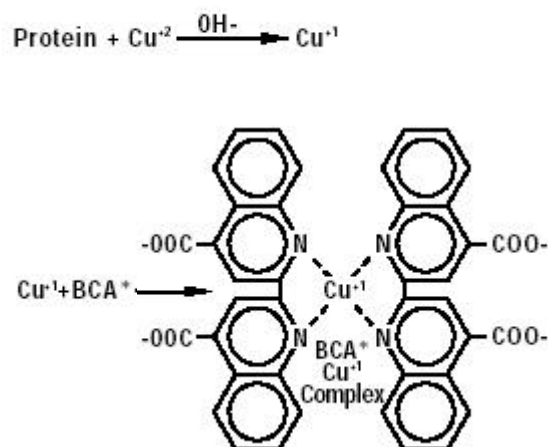


Abb. 3-4: Reaktion der Proteine mit dem BCA-Reagenz

3.6 Zytokin-Bestimmung mittels ELISA

ELISA ist eine Methode, bei der Antikörper oder Antigene in die Vertiefung von Polyvinylchlorid- oder Polystyrolplatten aufgezogen werden. In einer bestimmten Abfolge werden die Vertiefungen dann weiter mit Antikörpern, Antigen und enzymkonjugierten Antikörpern beschichtet. Der Nachweis der Antigene erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion (Rehm 2002).

Alle Zytokine wurden mit den OptEIA™-Sets von BD PharMingen bestimmt und nach dem vom Hersteller beschriebenen Protokoll durchgeführt. Untersucht wurden TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β und MCP-1. 96-Well-Immunoplaten wurden über Nacht mit dem im Coating-Puffer verdünnten Capture-Antibody (100 μ L) (**Tabelle 3-1**) bei 4 °C inkubiert. Der restliche ungebundene Capture-Antibody wurde verworfen und nach dreimaligem Waschen (Waschpuffer: 0,05 % Tween20 in PBS) wurden die Immunoplaten für eine Stunde mit 200 μ L Assay-Diluent (10 % FCS in PBS) bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde der Assay-Diluent verworfen und nach dreimaligem Waschen wurden die Platten mit den entsprechenden Proben bzw. Standard (100 μ L) inkubiert. Die Standardkurve wurde für TNF- α , IL-6 und MCP-1 im Bereich von 15,4 pg/mL bis 1000 pg/mL und für IL-10 und IL-1 β von 31,2 pg/mL bis 2000 pg/mL immer mitgeführt. Dann wurde der Überstand verworfen und nach 5maligen Waschen die Platten mit dem Working Detektor (100 μ L Detection-Antibody und Enzymreagenz verdünnt in Assay-Diluent) (**Tabelle 3-2**) inkubiert. Ausnahme ist IL-1 β , hier wurde erst der Detektion Antibody und dann das Enzymreagenz für jeweils eine Stunde zugegeben und die Platten zwischen diesen beiden Schritten fünfmal gewaschen.

Tab. 3-1: Coating-Puffer und Verdünnung für die Capture-Antibodies

Zytokin	Coating-Puffer pH 9,5 0,1 M Carbonat (8,4 g/L NaHCO ₃ , 3,56 g/L Na ₂ CO ₃)	Coating-Puffer pH 6,5 0,1 M Phosphat (16,1 g/L NaH ₂ PO ₄ , 11,8 g/L Na ₂ HPO ₄)	Verdünnung
TNF- α		X	1 : 250
IL-6	X		1 : 250
IL-10		X	1 : 250
IL-1 β	X		1 : 250
MCP-1		X	1 : 250

Tab. 3-2: Verdünnung von Detektion Antibody und Enzym Reagenz

Zytokin	Detection Antibody in Assay-Diluent	Enzyme Reagent in Assay-Diluent
TNF- α	1 : 250	1 : 250
IL-6	1 : 500	1 : 250
IL-10	1 : 250	1 : 250
IL-1 β	1 : 250	1 : 250 (extra)
MCP-1	Kein extra Detection-Antibody	1 : 250

Danach wurde der Überstand verworfen, siebenmal gewaschen und bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 100 μ L der Substratsolution inkubiert. 100 mL Substratsolution setzte sich aus 25,7 mL Na₂HPO₄ x H₂O, 24,3 mL C₆H₈O₇ x H₂O und 50 mL H₂O zusammen. Kurz vor Verwendung wurde zu 10 mL dieser Lösung eine Tablette Tetramethylbenzidine Dihydrochlorid und 2 μ L H₂O₂ zugesetzt. Nach 30 Minuten wurde 50 μ L der Stoppsolution (1 M H₃PO₄ oder H₂SO₄) zugegeben und innerhalb von 30 Minuten bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm die Platten gemessen.

3.7 Zellkernisolation

Die Isolation der Zellkerne erfolgte nach einer modifizierten Methode von Emig et al. (1995). Alle Schritte der Zellkernisolation wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und bei 800 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden in 3mL hypotonen Puffer aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Zellaufschluss, in dem die Zellen erst mit 6 Stößen im Dounce-Homogenisator aufgebrochen wurden und weitere 3 mL hypotonen Puffer und unter Vortexen vorsichtig 180 µL 10 % NP40 zugegeben wurden. Der hypotone Puffer setzte sich aus 10 mM Hepes, 24 mM KCl und 10 mM MgCl₂ x 6 H₂O zusammen und hatte einen pH-Wert von 7,5. Nachdem das Homogenisat dann für genau 10 Minuten auf Eis inkubiert wurde, erfolgte eine Überschichtung auf ein gleiches Volumen einer 1M Saccharose-Lösung in hypotonen Puffer. Zwischen Saccharose und Puffer war eine deutliche Grenze zu erkennen. Der Gradient wurde bei 1600 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 mL hypotonen Puffer aufgenommen, homogenisiert, wieder auf ein gleiches Volumen einer 1 M Saccharose-Lösung überschichtet und nochmals bei 1600 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und das Pellet in 1mL hypotonen Puffer aufgenommen wurde, erfolgte nochmals eine Zentrifugation bei 800 x g und 4 °C für 5 Minuten. Bei einer Ausgangszellzahl von mindestens 10⁷ Zellen wurde das Pellet für die PARP-Aktivitätsbestimmung in 250 µL PBS, für den Western Blot in 100 µL Lysepuffer und für die Cholesterolextraktion in 2,5 mL PBS aufgenommen.

3.8 Zellyse für MAP-Kinasen

Diese Art der Zellyse ist besonders geeignet für den nachfolgenden Nachweis von phosphorylierten MAP-Kinasen mittels Western Blot. Die Methode wurde nach der von Cell Signaling beschriebenen Art und Weise in leicht modifizierter Form durchgeführt (Cell Signaling Technology 2002, Inc).

Die Zellernte erfolgte, indem das Medium von den Zellen entfernt und diese dann in eiskaltem PBS mit einem Zellschaber gelöst wurden. Nach dem Zentrifugieren bei 800 x g und 4 °C für 10 min, wurde das PBS entfernt und 500 µL (auf ca. 10⁷ Zellen) eiskalter Lysepuffer dazugegeben. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Im Anschluss daran wurden die Proben auf Eis zehnmal durch Aufziehen und Herausdrücken mit einer 1 mL Insulinspritze homogenisiert. Alternativ dazu ist auch eine Ultraschallbehandlung auf Eis für 4 x 5 Sekunden möglich. Von den Proben wurde nach dem sich anschließenden Zentrifugationsschritt der Überstand abgenommen

und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser Überstand war das Zelllysate und konnte, falls notwendig, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Der Lysepuffer setzte sich aus 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton 100, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β -Glycerolphosphat, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/mL}$ Leupeptin, 1 mM PMSF (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch) zusammen, und musste bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

3.9 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

3.9.1 SDS-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen durch Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Für die Auftrennung sämtlicher Proteingemische wurde das diskontinuierliche Gel-System nach Lämmli (1970) verwendet, mit Tris-Glycin-Puffer und einem Sammelgel (0,5 M Tris pH 6,8), das ein Trenngel (1,5 M Tris pH 8,8) überschichtet. Es wurde vorwiegend ein 12%iges Trenngel verwendet, nur für Proteine mit einem Molekulargewicht von über 100 kDa wurde ein 10%iges Trenngel benutzt.

SDS PAGE (Lämmli) :

	Sammelgel	Trenngel		
		10 %	12 %	15 %
H_2O	3 mL	4,5 mL	4 mL	3,2 mL
Trenngelpuffer	---	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Sammelgelpuffer	1,25 mL (4 %)	---	---	---
37,5 % Acrylamid	(540 μL) 700 μL	2,7 mL	3,2 mL	4 mL
10 % SDS	50 μL	100 μL	100 μL	100 μL
10 % APS	(38 μL) 40 μL	50 μL	40 (50) μL	50 μL
TEMED	(13 μL) 20 μL	50 μL	40 (50) μL	50 μL

Für den Gellauf wurde die Gelkammer mit Elektrophoresepuffer (1 x 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) gefüllt und für das Sammelgel eine Spannung von 50 V und für das Trenngel eine Spannung von 180 V verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Zur Lokalisierung der Banden

wurde ein Marker mit einer definierten Proteinzusammensetzung eingesetzt.

5 x Probepuffer: 62,5 M Tris pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Saccharose, 1% MSH, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 % Bromphenolblau, Glycerin

3.9.2 Coomassie-Färbung

Um zu überprüfen, ob die Proteine gleichmäßig auf die Gele aufgetragen wurden, erfolgte eine Färbung mit Coomassie-Blau. Diese Art der Färbung hat eine Empfindlichkeit von 200-400 ng Protein/0,5 cm Bande und geschieht in saurer Lösung in einem Essigsäure-Methanol-Gemisch, wobei durch Essigsäure die Proteine auf dem Gel fixiert und positiv geladen werden. Die positiv geladenen Proteinreste und hydrophobe Wechselwirkungen ermöglichen die Bindung des Farbstoffes an die Proteine und beim anschließenden Entfärbungsprozess wird aus dem Gelbereich, der kein Protein enthält, der Farbstoff ausgewaschen.

Hierfür wurde das Gel für 20 Minuten in eine Coomassie-Färbelösung (0,05 % Coomassie-Blue R250, 6 % TCA, 7 % Eisessig, 20 % gefiltertes Methanol) gelegt und anschließend für weitere 10 min in einen Coomassie-Entfärber (7 % Eisessig, 40 % Methanol). Das weitere Entfärben erfolgte in 10% Essigsäure, welche so lange gewechselt wurde, bis das Gel genügend entfärbt war. Die fertig gefärbten Gele wurden danach eingescannt.

3.9.3 Western Blot

Das Prinzip des Blottens besteht darin, Proteine des Gels auf eine Membran zu übertragen, um sie anschließend mit entsprechenden Antikörpern reagieren zu lassen. Die Blotmembran besteht aus Nitrocellulose, welche die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen binden kann.

Die Nitrocellulose-Membran wurde auf die entsprechende Größe zurechtgeschnitten und für 15 Minuten in Blotpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol) eingeweicht. Blotpapier und Gel wurden ebenfalls vor dem Transfer in Blotpuffer getränkt. In der Reihenfolge Blotpapier – Membran - Gel - Blotpapier wurden diese in die Blotkammer gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei 15 V und bei Verwendung eines dicken Gels (1,5 mm) für 40-70 Minuten in Abhängigkeit von der Größe des Proteins.

Vor der Reaktion des Blotes mit einem Antikörper wurden die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran mit 10 % FCS oder 5 % Milchpulver abgesättigt. Nach dem Blocken für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde der Blot dreimal für 5 Minuten mit PBT (PBS mit 0,1 % Tween20) gewaschen. Der geblockte Blot wurde dann über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit dem

primären Antikörper inkubiert. Alternativ konnte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur erfolgen. Danach folgte die Entfernung des restlichen noch ungebunden primären Antikörpers, indem der Blot erneut 3 x 5 Minuten mit PBT gewaschen wurde. Nun konnte der entsprechende sekundäre Antikörper (in PBT) für 1 Stunde dazugegeben werden. Der Blot wurde dann noch einmal 3 x 5 Minuten mit PBT gewaschen, um wieder noch ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen.

Die Verdünnung der primären und sekundären Antikörper (Ak) war wie folgt:

primär Ak	Verdünnung	kDa	sekundär Ak Verdünnung	
α -Mek1/2	1:1000 5 % BSA	45	anti-rabbit	1:1000
α -p-Mek1/2	1:1000 5 % BSA	45	anti-rabbit	1:1000
α -Erk1/2	1:20000 5 % BSA	44/42	anti-rabbit	1:1000
α -p-Erk1/2	1:1000 5 % milk	44/42	anti-mouse	1:2000
α -p38	1:1000 5 % BSA	43	anti-rabbit	1:1000
α -p-p38	1:1000 5 % BSA	43	anti-rabbit	1:1000
α -SAPK/JNK	1:1000 5 % BSA	46/54	anti-rabbit	1:1000
α -p-SAPK/JNK	1:2000 5 % milk	46/54	anti-mouse	1:2000
α -creb (Ser133)	1:1000 5 % BSA	43	anti-rabbit	1:1000
α -p-creb (Ser133)	1:1000 5 % BSA	43	anti-rabbit	1:1000
α -Elk-1	1:1000 5% BSA	43	anti-rabbit	1:1000
α -p-Ekl-1	1:1000 5% milk	43	anti-mouse	1:2000
iNOS	1:10000 PBT	130	anti-rabbit	1:1000

Der primäre Antikörper ist spezifisch für ein bestimmtes Protein. An diesen Anti-Antigen-Antikörper bindet dann der sekundäre Antikörper, der wiederum spezifisch ist für Proteine der Spezies (meist Hase, Kaninchen oder Maus), in welcher der primäre Antikörper hergestellt wurde. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Peroxidase markiert, welche die Oxidation von Luminol katalysiert und damit eine Chemilumineszenz auslöst, die dann auf einem Film festgehalten werden kann.

Die ECL-Lösung wird in der Dunkelkammer aus Lösung 1 und 2 (Verhältnis 1:1) gemischt. Auf die Proteinseite einer Membran wurden 3 mL des Gemisches gegeben und für eine Minute inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und ein Film auf die in Plastikfolie eingewickelte Membran gelegt. Der Film wurde 15 Sekunden bis 15 Minuten, je nach Intensität der Chemilumineszenz, belichtet und eine Minute in den Entwickler und 10 Minuten in den Fixierer getaucht, wobei der Film jeweils nach dem Entwickler und Fixierer mit Wasser gewaschen wurde.

3.10 Messung der PARP-1-Aktivität

Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) bindet an denaturierte DNA. Hierbei kommt es durch die PARP-1 zu einer Aufspaltung von NAD^+ in Nicotinamid und ADP-Ribose und anschließend zu einer Polymerisation von ADP-Ribose-Ketten an Akzeptorproteine im Kern wie Histone oder die PARP selbst (Virag and Szabo, 2001). Diese Aktivität der PARP-1 kann durch Verwendung von radioaktiv markierten NAD^+ gemessen werden. Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung der aus ^{32}P - NAD^+ -Molekülen synthetisierten ADP-Ribose-Polymerketten an die Proteine. Diese werden dann anschließend mit Trichloressigsäure ausgefällt. Der Anteil präzipitierter ^{32}P -Aktivität kann proportional als Index für den Verbrauch von ADP-Molekülen bzw. NAD -Molekülen angesehen werden und gilt als Maß für die PARP-Aktivität.

Das PARP-Assay erfolgte in Anlehnung an Virag und Szabo (2001). *In vitro* Untersuchungen wurden durch zeitabhängige Inkubation bei Raumtemperatur mit 0,5 $\mu\text{g/mL}$ rekombinater PARP-1 aus *Escherichia coli* bzw. Kernisolaten von ca. 4×10^6 Zellen/mL durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt weiter 10 mM Tris pH 8,7 mM MgCl_2 , 50 μM ZnCl_2 , 1 mM NAD^+ , 0,2 μCi ^{32}P - NAD^+ (10^5d pm). Vor Zugabe des Startreagenz wurde dieser Reaktionsansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Startreagenz wurde je nach Versuchsreihe 2 $\mu\text{g/mL}$ 7-Ketocholesterol, 500 $\mu\text{g/mL}$ genomische Herings-DNA, 500 $\mu\text{g/mL}$ sonifizierte Herings-DNA oder 2 $\mu\text{g/mL}$ 7-Ketocholesterol/500 $\mu\text{g/mL}$ genomische Herings-DNA eingesetzt. Da die Ausgangsverdünnung von 7-Ketocholesterol in Ethanol angesetzt worden war, wurde ein Kontrollansatz mit 0,02 % Ethanol als Startreagenz mitgeführt. Gestoppt wurde die Reaktion mit 1,5 Teilen 20 % TCA (150 μL) und 0,5 Teilen BSA (10 mg/mL) (50 μL). Die Präzipitation erfolgte

für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde bei 10000 x g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals in 1,5 Teilen 20 % TCA (150 µL) gelöst und wieder zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 150 µL PBS und 3 mL Szintilationsflüssigkeit aufgenommen und im Szintilationszähler gemessen.

3.11 Induktion und klinische Erhebung von aktiver EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis)

3.11.1 Durchführung der EAE

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) dient als Modell für Multiple Sklerose mit zeitweilig wiederkehrender Paralyse (Brocke et al. 1993). Bei 68 Wochen alten SJL-Mäusen (weiblich, ca. 20 g Körpergewicht, Charles River) erfolgte eine subkutane Immunisierung mit 100µg/Maus PLP (Proteolipid Protein) 139-151 in 0,2 mL Emulsion bestehend aus gleichen Volumenanteilen PBS und CFA (Complete Freund's adjuvant) angereichert mit abgetöteten Zellwandbestandteilen von *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA in einer Endkonzentration von 4 mg/L. Am Tag 0 und 2 wurden zur Verstärkung der Immunantwort 200 ng/Maus Pertussis-Toxin verabreicht. In der SJL/J-Maus führt eine erfolgreiche Immunisierung zu einer der schubförmigen MS ähnlichen klinischen Verlaufsform mit Phasen der Behinderung und Remission. Die Mäuse wurden jeden Tag auf ihre EAE hin wie folgt bewertet (Raine 1984): 0...nicht krank, 1...geschwächter Schwanz, 2...teilweise gelähmte hintere Extremitäten, 3...vollständige Lähmung der hinteren Extremitäten, 4...vollständige Lähmung der hinteren Extremitäten und geschwächte vordere Extremitäten oder komplette Lähmung, 5...Tiere sterbend oder tot. Des Weiteren erfolgte eine Extraktion und HPLC-Analyse von je 4 Hirnarealen und Rückenmark der jeweiligen Mäuse in verschiedenen Krankheitsstadien.

3.11.2 Immunohistochemie und Bewertung

Die Mäuse wurden narkotisiert und mit 4 % Paraformaldehyd perfundiert. Die mit dem Vibratom angefertigten 50 µm-Schnitte des ZNS wurden in eine 3 %-H₂O₂-Lösung getaucht, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu unterdrücken. Die Schnitte wurden gewaschen und mit 10 % Normalserum und 0,5 % Triton X-100 blockiert, bevor sie über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper der Anti-aktive-Caspase 3 (1:100) inkubiert wurden. Das Immunolabeling der Schnitte erfolgte mit der Avidin/Biotinylated Enzymkomplex-Technik. Nachfolgend wurden die Schnitte mit Diaminobenzidin als Substrat entwickelt. IG-Kontroll-Experimente wurden für alle primären

Antikörper durchgeführt und unter diesen Bedingungen war keine Färbung zu beobachten. Die Schnitte wurden mittels Nisselfärbung gegengefärbt. Caspase-3-positive Neuronen wurden in den Schnitten des Hirnstammes von zwei unabhängigen Experimentatoren „blind“ gezählt. Vier Sichtfelder, die sich auf beiden Seiten der Mittellinie des motorischen Bereiches des Hirnstammes befanden, wurden für diese Caspase3⁺-Neuronen ausgezählt und mit einem 20fach vergrößerndem Objektiv dokumentiert. Es wurde der Durchschnitt von drei Tieren zu je vier Schnitten pro Maus analysiert und im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

Die EAE-Experimente wurden von O. Aktas (Institut für Neuroimmunologie, klinischer und experimenteller Neuroimmunologie, Universitäts-Krankenhaus Charité, Berlin) durchgeführt.

3.12 Herstellung der Cholesterolverdünnungen

Alle Stocklösungen für 7-Ketocholesterol, 25-Hydroxycholesterol und Cholesterol wurden in Ethanol hergestellt. Die Endkonzentration von Ethanol im Medium betrug 0,02 %. Diese Konzentration ist für die Zellen nicht schädlich (Hayden et al. 2002).

Für 7-Ketocholesterol und Cholesterol wurden Stocklösungen mit Ethanol in einer Konzentration von 50 mg/mL hergestellt. Für die Versuche im 6-Well-Format (4 mL Medium/Well) wurde daraus mit sterilem PBS eine 1:12,5 Verdünnung angesetzt, so dass eine Endkonzentration von 4 mg/mL vorlag. Wurden die Versuche im Flakon (T75) bzw. im Dish mit 20 mL Medium durchgeführt, so erfolgte eine 1:2,5-Verdünnung der Stocklösung mit PBS auf eine Konzentration von 20 mg/mL.

Die Stocklösung für 25-Hydroxycholesterol wurde im Originalgefäß von Sigma angesetzt, in dem auf 25 mg Substanz 500 µL Ethanol gegeben wurde. Die Endkonzentration betrug 50 mg/mL. Zu dieser Lösung erfolgte dann die Zugabe von 750 µL sterilem PBS, so dass die Konzentration nun 20 mg/mL betrug. Dies wurde gut durchmischt und 1 mL davon in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Auf die restlichen 250 µL im Originalgefäß wurden nochmals 1 mL steriles PBS gegeben, so dass die Endkonzentration dann 4 mg/mL betrug.

Für die einzelnen Versuche wurden für eine Endkonzentration von 10 µg/mL dann jeweils 10 µL aus dem entsprechenden Stock zum Medium gegeben.

3.13 RNA-Midi-Präparation

Mittels RNA-Midi-Präparation soll RNA länger als 200 Basenpaare durch Bindung an eine Silicagel-Membran isoliert werden. In einem Puffer, welcher das denaturierende Agens Isothiocyanat (GITC)

enthält, werden die Proben hierfür erst lysiert und homogenisiert. Dies stellt die sofortige Inaktivierung der RNase sicher und ermöglicht die Isolation von intakter RNA. Unter entsprechenden Bedingungen wird Ethanol zugesetzt und die Proben auf eine Säule gegeben, auf welcher die RNA binden kann und Verunreinigungen ausgewaschen werden. Die aufgereinigte RNA kann danach mit RNase-freiem Wasser von der Säule gewaschen und so weiter verwendet werden.

Die RNA-Midi-Präparation wurde bei Raumtemperatur und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Adhärenz wachsende Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Flakonboden gelöst und gezählt. Die Sollzahl betrug 5×10^6 bis 3×10^7 Zellen. Die Zellen wurden einmal mit sterilem PBS gewaschen, falls nötig auf die Sollzellzahl eingestellt und dann bei 1000 rpm für 5 Minuten herunterzentrifugiert. Anschließend wurde auf das Pellet 1 mL des RLT-Lysepuffers (mit GITC und 14,3 M MSH) gegeben und die Zellen resuspendiert. Dann wurden die Proben durch 10 Sekunden Vortexen und durch 5-10maliges Aufziehen in einer RNase-freien Spritze mit einer kleinen Kanüle homogenisiert. Zum Lysat wurde 2 mL 70 % Ethanol geben und dieses geschüttelt. Das Lysat wurde nachfolgend auf die RNeasy-midi-Säule in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, 10 Minuten bei 3000-5000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte nun das Waschen der Säule mit 4 mL RW1-Waschpuffer (mit GITC) und 2 x 2,5 mL RPE-Waschpuffer (mit 4 Volumenanteilen Ethanol), wobei zwischen den Waschschritten für 5 Minuten mit 3000-5000 x g zentrifugiert wurde. Nachdem die Säule getrocknet war, erfolgte die Elution der RNA mit 100 µL RNase-freiem Wasser. Dafür wurde die Säule in den Tube aus dem Kit gesetzt, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 3 Minuten bei 3000-5000 x g zentrifugiert. Das Gleiche wurde noch einmal mit 50 µL RNase-freiem Wasser wiederholt. Die RNA konnte so in einem sterilen Eppendorfgefäß bei -80°C gelagert werden.

Die Quantität der RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Es wurde hierfür eine Verdünnung von 1:50 hergestellt und als Leerwert DEPC-Wasser (mit 0,1 % DEPC autoklaviertes Milipore) verwendet. Die Konzentrationsberechnung war wie folgt:

$$\text{Extinktion} \times 50 (\text{Verdünnung}) \times 40 (\text{Faktor RNA}) = \mu\text{g/mL RNA}$$

Schließlich folgte noch eine Qualitätsanalyse mit einem 2 % Agarose-Ethidiumbromid-Gel. Für das Gel wurden 1 g Agarose in 50 mL TAE-Puffer mittels Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Sobald die Lösung genügend abgekühlt war, wurden 2 µL Ethidiumbromid (1 mg/mL) zugeben und das Gel gegossen. 10 µg RNA wurden mit RNA-Puffer (5x) und DEPC-Wasser gemischt und auf das Gel aufgetragen.

3.14 DNA-Mikroarray

Die DNA-Mikroarray Analysen wurden mittels Affymetrix-Chips von Dr. Mogens Krühøffer (Universität zu Aarhus in Dänemark) durchgeführt.

Affymetrix verwendet hierfür Kontrollen von Oligonukleotiden, die auf der Oberfläche von entsprechenden Chips synthetisiert sind. Ein solcher Chip besteht aus mehreren hunderttausend Quadraten, wobei jedes die Kopien eines Oligos enthält. Das resultiert in hunderttausend verschiedene Oligos, die als millionenfache Kopie existieren. Diese große Anzahl von Oligos, welche bis zu 25 Nukleotide lang sind, hat sich zu einem bedeutenden experimentellen Instrument entwickelt, welches eine Reihe von aufwendigen Methoden ersetzen kann. Für die Expressionsanalyse eines Gens sind im Durchschnitt 40 solcher Oligos nötig.

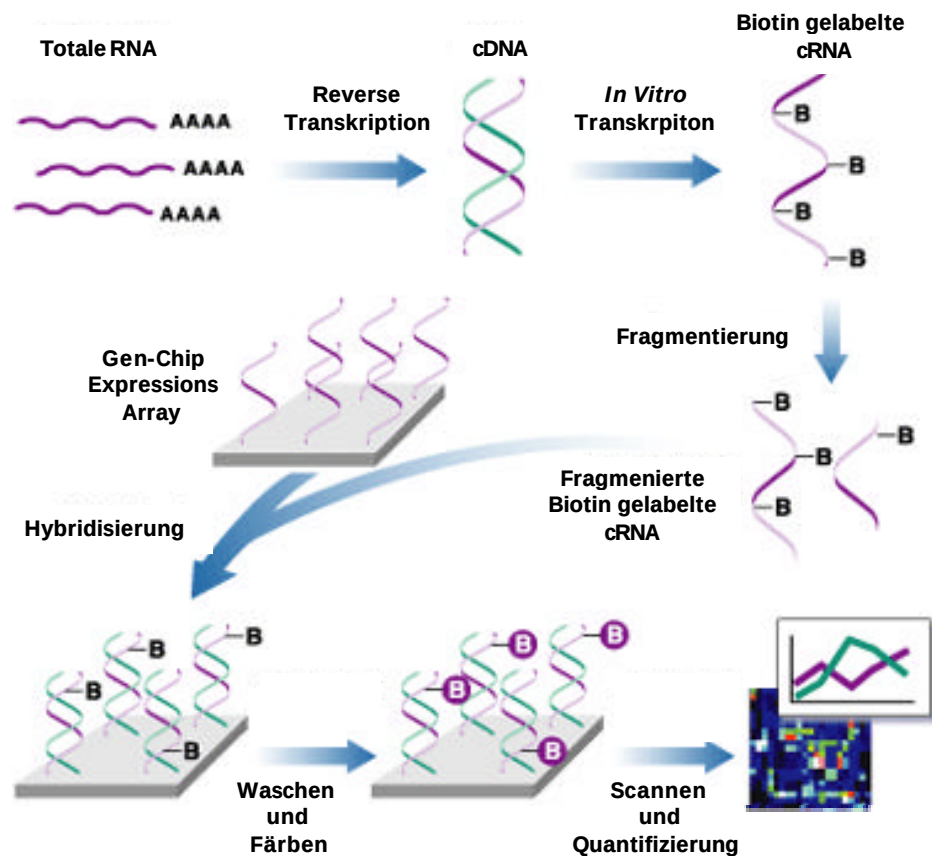


Abb. 4-5: Standardisiertes Expressions-Assay für eukaryotische Gene

An diese Oligos wird dann entsprechend vorbereitete mRNA hybridisiert. Um die Hybridisierung der Ziel-mRNA einer Probe auf dem Chip zu detektieren, muss diese jedoch noch mit einem Fluorochrom angefärbt werden. **Abbildung 4-5** zeigt die gängige Abfolge der einzelnen Schritte,

die für die Hybridisierung und die Anfärbung eines solchen Chips nötig sind.

Aus der unter 3.13 isolierten RNA wird mittels einer poly-T-Säule die mRNA isoliert. Diese wird dann unter Verwendung eines poly-T-Primers und einer reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt. Mittels einer T7-RNA-Polymerase und in Anwesenheit von Biotin-UTP und Biotin-CTP wird die cDNA amplifiziert und man erhält dann 50 bis 100 Kopien einer Biotin-gelabelten cRNA. Die anschließende Fragmentierung erfolgt dann gewöhnlich in einem entsprechenden Puffer bei 94 °C, so dass aus der cRNA Fragmente mit einer Länge von 35 bis 300 Nukleotiden entstehen. Im nächsten Schritt werden diese Fragmente auf den entsprechenden Chip hybridisiert und das nicht hybridisierte Material wird heruntergewaschen. Die Biotin-gelabelten cRNA-Fragmente werden mit Streptavidin-Phycoerythrin angefärbt und der überflüssige Farbstoff wird wieder heruntergewaschen. Um das Signal noch zu verstärken wird der Chip mit einem IgG aus Ziege und einem biotinylierten Antikörper behandelt. Anschließend wird der Chip gescannt und quantifiziert (Knudsen 2004).

3.15 Übersicht über die Durchführung der Experimente

Akkumulation von 7-Ketocholesterol im Gehirngewebe

Für die Akkumulation von 7-Ketocholesterol im Gehirngewebe wurden 6 verschiedene Reihen mit OHSKs angefertigt. Es gab 6 Zeitwerte, das heißt dass die OHSKs nach 0, 2, 4, 8, 24 und 72 Stunden geerntet und wie unter 3.2 beschrieben extrahiert wurden, und der 7-Ketocholesterolgehalt mittels HPLC bestimmt wurde. Die Versuche wurden drei- bis sechsfach durchgeführt und es gab folgende Reihen: eine Kontrolle, die nur den reinen Slice enthielt, OHSKs mit 10^5 BV-2-Mikrogliazellen, OHSKs mit 12 Stunden LPS(10µg/mL)-voraktivierten BV-2, OHSKs mit BV-2 und dem Radikalfänger DMPO, OHSKs mit LPS-voraktivierten BV-2 und dem Radikalfänger DMPO sowie Slices, die vorher für 24 Stunden mit 50 µM NMDA behandelt wurden, um lebende Neuronen zu eliminieren, und auf die erst danach die BV-2-Zellen transferiert wurden. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte dann jeweils die Zugabe von 10 mg/L 7-Ketocholesterol.

Des Weiteren wurden BV-2 Mikrogliazellen mit und ohne 12-stündiger LPS-Voraktivierung mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol inkubiert. Die Zellernte erfolgte jeweils nach 0, 0.5, 1, 2, 7 und 8 Stunden. Zum einen erfolgte eine direkte Weiterbehandlung der Zellen wie unter 3.2 beschrieben und zum zweiten erfolgte vor der Extraktion und HPLC noch eine zusätzliche Isolierung der Zellkerne, welche dann wie beschrieben weiter behandelt wurden. Die Experimente wurden drei- bis sechsmal wiederholt. Im Zusammenhang mit diesem Experiment wurde gleichzeitig die

Zelltodrate mittels Trypanblaufärbung (s. 3.4.2) bestimmt.

Die Produktion von 7-Ketocholesterol durch primäre Neuronen wurde untersucht, indem diese mit 50 μ M NMDA inkubiert wurden und die Zellen nach den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 24 Stunden extrahiert und der 7-Ketocholesterolgehalt mittels HPLC analysiert wurden. Die hippocampalen Neuronenkulturen HT22 wurden mit 20 mM Glutamat bzw. 10 mg/L 7-Ketocholesterol inkubiert und nach 0, 1, 2, 4 und 24 Stunden der 7-Ketocholesterolgehalt über Extraktion und HPLC-Analyse bestimmt. Für die HT22 wurde gleichzeitig die Zelltodrate mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

Entzündungsmodell für 7-Ketocholesterol in der Schnittkultur

Drei Tage nach Transfer der BV-2 Mikrogliazellen mit und ohne 7-Ketocholesterol (10 mg/L) wurde der Zelltod in den neuronalen Schichten (Cornu ammonis und Gyrus dentatus) mittels Propidiumjodidfärbung dokumentiert, in Kryostatschnitten quantifiziert und mit Schnittkulturen ohne transferierte BV-2 Mikrogliazellen mit und ohne 7-Ketocholesterol verglichen. Die Neuronen wurden durch doppelte Fluoreszenzfärbung des nukleären Kernproteins und der Neurofilamente identifiziert. Die Mikroglia wurden ebenfalls durch eine spezifische immunohistochemische Färbung mit *Griffonia simplicifolia* isolectin IB4⁺ identifiziert.

7-Ketocholesterol in Gehirnen von MS-Patienten und während EAE

Tiefgefrorene Stücke autopsierten Gehirngewebes von Patienten mit akuter MS (n = 3), chronischer MS (n = 6) und Kontrollpatienten (n = 7) wurden von C. S. Raine (Albert Einstein College of Medicine, New York) geliefert. Die Entnahme erfolgte postmortem nach 8 Stunden (+/- 0 Stunden) bei Patienten mit akuter MS, nach 3,5 Stunden (+/- 0,9 Stunden) bei Patienten mit chronischer MS und nach 7,6 Stunden (+/- 1,3 Stunden) bei den Kontrollpatienten. Das Gewebe von akuten Fällen enthielt nachweislich gliotische Läsionen mit kürzlich aufgetretener inflammatorischer Aktivität am Rand der Läsion und einige frische MS-Läsionen mit Ödemen, mit demyelinisierender Aktivität, reich an inflammatorischen Zellen und hypertrophen Astrozyten. Die chronischen Fälle zeigten Läsionen, welche stark gliotisch waren und demyelinisiert mit geringer Inflammation (Raine 1997).

Die EAE-Proben wurden, aufgenommen in PBS/0,01 % BHT und getrennt in Rückenmark, Kleinhirn und vier Großhirnarealen, von O. Aktas (Institut für Neuroimmunologie, klinischer und experimenteller Neuroimmunologie, Universitäts-Krankenhaus Charité, Berlin) geliefert. Die Durchführung der EAE, Immunohistochemie und Bewertung der EAE erfolgte ebenfalls am Institut für Neuroimmunologie. Untersucht und verglichen wurden Tag 0, 12 und 21.

MS und EAE Proben wurden extrahiert und der 7-Ketocholesterolgehalt mittels HPLC, wie unter 3.2

beschrieben, bestimmt.

PARP-Aktivität unter 7-Ketocholesteroleinfluss

Zur Untersuchung der PARP-1 wurden die Zellkerne von BV-2 Mikrogliazellen, wie unter 3.7 beschrieben, isoliert und für 20 Minuten in dem Reaktionsansatz des PARP-Assay (s. 3.10) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe 2mg/L 7-Ketocholesterol bzw. dem äquivalenten Lösungsmittel der 7-Ketocholesterol-Verdünnung ohne 7-Ketocholesterol als Kontrolle gestartet. Es ergaben sich somit zwei verschiedene Reihen, die jeweils sechsfach wiederholt wurden.

Im zweiten Ansatz wurde rekombinante PARP-1 im Reaktionsansatz für 20 Minuten vorinkubiert. Es wurden 4 Reihen aufgestellt, die neunmal wiederholt wurden. Der Reaktionsstart erfolgte jeweils mit nativer DNA + 2 mg/L 7-Ketocholesterol, 2mg/L 7-Ketocholesterol, sonifizierter DNA oder nativer DNA.

In beiden Experimenten wurden die Reaktionen nach 0, 5, 10, 15, 20, 45 und 60 Minuten gestoppt und wie unter 3.10 beschrieben weiterbehandelt.

Messung der Zytokine, NO und MTT.

BV-2-Zellen wurden mit einer Zelldichte 5×10^4 Zellen/mL im 6-Wellformat ausgesät. Der Inkubationsstart mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol erfolgte rücklaufend, d. h. beginnend mit dem 48-Stundenwert, so dass die Zeitwerte 0, 1, 6, 16, 24 und 48 Stunden zur gleichen Zeit geerntet werden konnten. Das überstehende Medium wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren und dort bis zur Analyse mittels ELSIA (s. 3.6) aufbewahrt. Die Versuche wurden mindestens vierfach durchgeführt.

Für das Griess-Assay (s. 3.3) und das MTT-Assay (s. 3.4) wurden BV-2-Mikrogliazellen mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/mL in 96-Well-Format ausgesät. Die Zugabe von 10 mg/L 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol erfolgte wieder rücklaufend. Die NO-Bestimmung wurde in sechsfacher Wiederholung zu den Zeitpunkten 0, 2, 6, 15, 24 und 48 Stunden durchgeführt, während das MTT-Assay 5 mal mit den Zeitwerten 0, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden wiederholt wurde.

Vorbereitung zum Western Blot für iNOS und MAP-Kinasen.

Die Versuche zur Ermittlung der Aktivierung der iNOS bzw. MAP-Kinasen wurden in der Zellkulturschale (d = 10 cm) durchgeführt. Zeitwerte wurden für die iNOS von 0 bis 6 Stunden und für die MAP-Kinasen von 0 bis 15 Stunden genommen, mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol,

25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol. Der Inkubationsstart erfolgte wieder rückläufig, so dass die Zellernte und anschließende Zellyse (s. 3.8) gleichzeitig erfolgte. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die einzelnen Versuchsreihen mindestens dreimal wiederholt.

DNA-Mikroarray

Für das DNA-Mikroarray wurden BV-2-Mikrogliazellen mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol behandelt. Neben der Kontrolle gab es insgesamt 3 Zeitwerte mit 0,5 , 2 und 4 Stunden. Von diesen Zellen wurde die RNA isoliert. Das DNA-Mikroarray selbst wurde von Prof. Mogens Kruehoffer (Universität von Aarhus in Dänemark) durchgeführt.

3.16 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Daten wurde von den jeweiligen Messwerten (X_i) das arithmetische Mittel bzw. der Mittelwert gebildet ($\bar{X}$). Dieser definiert sich wie folgt:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \cdot \sum X_i$$

Um die Daten jedoch zu charakterisieren braucht man ein Maß für ihre Variabilität oder Streuung. Um die Varianz zu berechnen, kann folgende Formel verwendet werden:

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum (X_i - \bar{X})^2$$

Da es sinnvoller ist, die Streuung in der selben Einheit wie die Originaldaten auszudrücken, wird aus diesem Wert noch die Quadratwurzel gezogen und man erhält so die Standardabweichung.

$$S = \sqrt{S^2}$$

Zur Überprüfung der Signifikanz zweier Mittelwerte wird der t-Test unter Berücksichtigung der Vergrößerung von t und der Freiheitsgrade verwendet. Handelt es sich hierbei um Stichproben, die ungleich groß sind, berechnet sich der Freiheitsgrad wie folgt:

$$FG = n_1 + n_2 - 2$$

Bei den vorliegenden Untersuchungen durfte die Fehlerrate nicht größer als 5 % ($p = 0,05$) sein.

In der t-Tafel wird der kritische t-Wert gesucht, der diesem Wert dann entspricht. Für die Durchführung eines t-Testes wird zunächst die Standardabweichung des durchschnittlichen

Unterschiedes zweier Proben berechnet.

$$S_d = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}$$

Danach kann t berechnet werden.

$$t' = \frac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{S_d}$$

Man kann diese Gleichung auch umstellen und die kritische Distanz für zwei Mittelwerte berechnen.

$$\overline{X_1} - \overline{X_2} = t_{0,05,FG} \cdot S_d$$

Erreicht oder überschreitet ein gemessener Wert diese kritische Distanz, wird die Nullhypothese, die besagt, dass sich die beiden Mittelwerte nicht signifikant voneinander unterscheiden, verworfen und ein Wert wird als signifikant eingestuft (Bärlocher 1999).

4 Ergebnisse

4.1 Akkumulation und Abbau von 7-Ketocholesterol im Gehirngewebe

Vorangegangene Studien der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass 7-Ketocholesterol im Liquor von Patienten mit primären und starken neuroinflammatorischen Krankheiten (z. B. Meningitis oder viraler Enzephalitis) und bei Multiple-Sklerose-Patienten, im Vergleich zu Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS (z. B. Alzheimer) und Patienten mit keinerlei Erkrankung des ZNS, in erhöhten Mengen vorkommt. Dabei wiesen die Multiple Sklerose Patienten eine höhere 7-Ketocholesterolkonzentration als Patienten mit neuroinflammatorischen Krankheiten auf (Diestel et al. 2003).

Es stellte sich also zunächst die Frage: **Setzen Neuronen nach oxidativer Schädigung 7-Ketocholesterol frei und welche Rolle spielen Mikroglia hierbei?**

Um nun herauszufinden, ob die Produktion von 7-Ketocholesterol die Folge einer Inflammation ist, musste die Konzentration von 7-Ketocholesterol in einer inflammatorischen Umgebung untersucht werden. Diese Bedingung kann mit organotypischen hippokampalen Hirnschnittkulturen (OHSK) gewährleistet werden. Hierbei handelt es sich um ein anerkanntes Modell, welches morphologischen und physiologischen Formen einer *in vivo* Situation bietet. Die OHSKs wurden mit Mikrogliazellen, mit und ohne LPS-Stimulation, inkubiert. Diese Mikrogliazellen wandern dann in das lebende Hirngewebe ein. Die durch einwandernde Mikroglia hervorgerufene Inflammation könnte eine zusätzliche Freisetzung von 7-Ketocholesterol bewirken und so den Entgiftungsmechanismus des Gehirngewebes stören.

Nach Zugabe von 7-Ketocholesterol (10 mg/L) wurde zunächst die 7-Ketocholesterolkonzentration in OHSK in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dabei erfolgte ein Vergleich von Kontrollschnitten ohne Mikrogliaeinwanderung mit Schnitten, auf die BV-2-Mikrogliazellen gegeben wurden. Bei der Behandlung mit Mikrogliazellen wurde dann noch eine Unterscheidung hinsichtlich ihrer Stimulierung mit LPS gemacht. Für die Bestimmung der 7-Ketocholesterolkonzentrationen wurden die Proben extrahiert und mittels HPLC analysiert (s. 3.2). In **Abbildung 4.1** ist eine starke Akkumulation von exogen zugegebenen 7-Ketocholesterol in den von Mikrogliazellen überwanderten OHSKs zu erkennen. 7-Ketocholesterol wird relativ schnell aufgenommen. Das erfolgte besonders intensiv nach Zugabe von voraktivierten Mikroglia. Nach einem Maximum bei 8

Stunden zeigte sich jedoch ein starker Abbau von 7-Ketocholesterol. Die zusätzliche Voraktivierung der Mikroglia führte neben einer stärkeren Akkumulation von 7-Ketocholesterol auch zu einem schnelleren und intensiveren Abbau des Selbigen. Nach 24 Stunden konnte immer noch eine etwas erhöhte 7-Ketocholesterolkonzentration gemessen werden, die sich über den Zeitraum von 72 Stunden auch nicht mehr wesentlich veränderte. Im Gegensatz dazu wurde in OHSKs ohne Mikrogliaeinwanderung keine Veränderung der zellulären 7-Ketocholesterolkonzentration nach Zugabe von 10 mg/L exogenem 7-Ketocholesterol gemessen. Die Tatsache, dass 7-Ketocholesterol in von Mikroglia unterwanderten OHSKs so schnell aufgenommen und abgebaut wird, weist darauf hin, dass Mikroglia sich sowohl an der Aufnahme als auch am Abbau von 7-Ketocholesterol beteiligen.

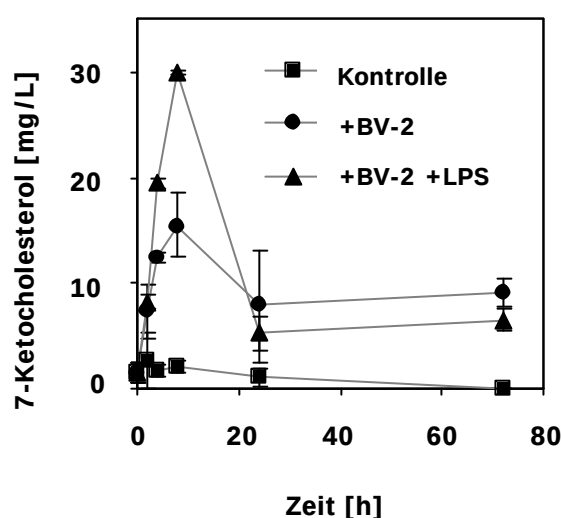


Abb. 4-1: Produktion von 7-Ketocholesterol in hippokampalen Hirnschnittkulturen nach Einwanderung von mikroglialen Zellen. Konzentration von 7-Ketocholesterol in lebendem Hirngewebe von OHSKs nach Übertragung von 10^5 BV-2-Zellen mit (+ BV-2 + LPS) und ohne (+ BV-2) vorangegangener Aktivierung mit LPS im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Daten sind als MW angegeben mit SD < 10 %, n = 6

Als nächstes sollte die pathologische Relevanz von 7-Ketocholesterol in der Konzentration, wie sie bei MS-Patienten gefunden wurde, betrachtet werden. Deshalb wurde untersucht, ob 7-Ketocholesterol eine toxische Wirkung auf Neuronen in lebenden Hirngeweben ausübt. Hierfür wurden BV-2-Mikrogliazellen (10^5 Zellen/OHSK), 7-Ketocholesterol (10 mg/L) bzw. BV-2 und 7-Ketocholesterol zusammen auf organotypische Schnittkulturen gegeben und nach 3 Tagen der Zelltod mittels Propidiumjodidfärbung (PI) (s. 3.4.3) bestimmt. Das wurde mit einem Kontrollschnitt, der auf die gleiche Art gefärbt wurde, verglichen. Um zu untersuchen, ob es sich

hierbei um Neuronen oder Mikroglia handelt erfolgte zusätzlich eine Anfärbung der Neuronen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gegen neuronale Kernproteine und eine Neurofilamentfärbung (s. 3.4.3). Die Mikrogliazellen wurden spezifisch mit IB_4^+ angefärbt und mit der PI-Färbung verglichen.

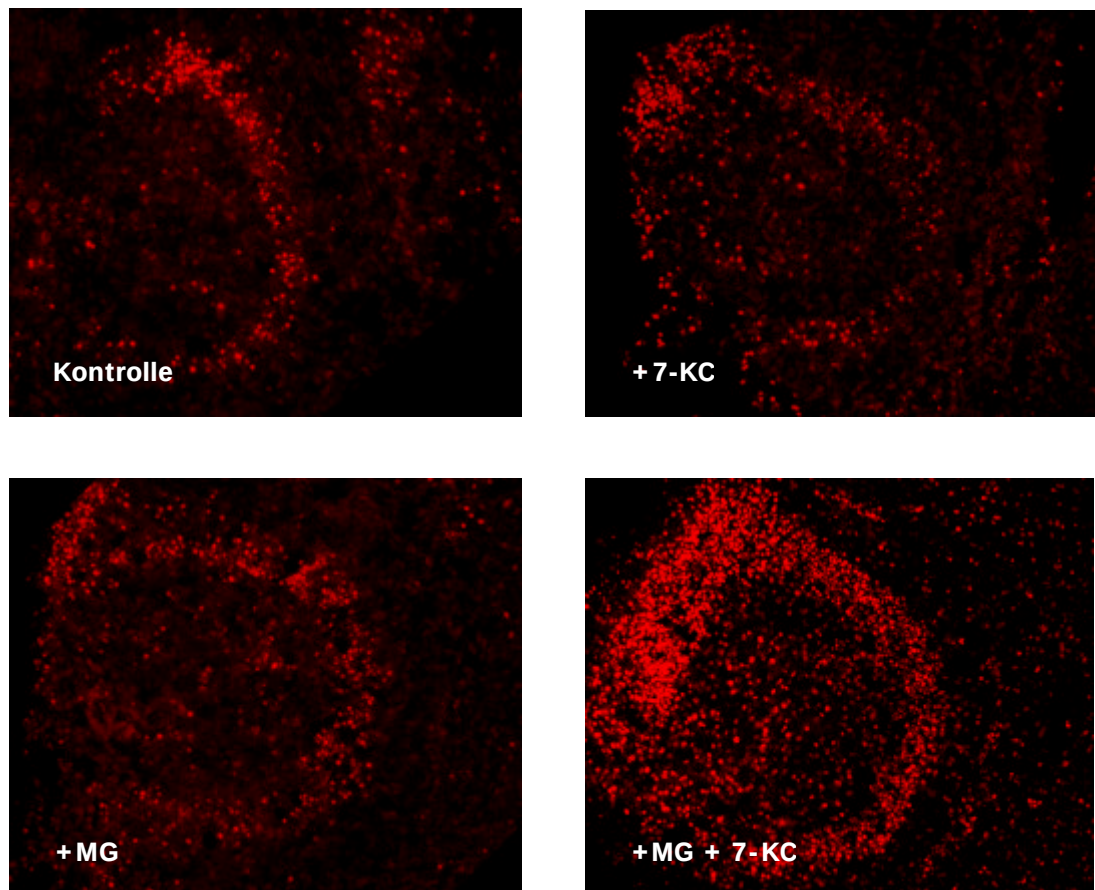


Abb. 4-2: 7-Ketocholesterol induziert mikroglial vermittelte Neuronenschädigung in lebendem Hirngewebe. Die Bilder zeigen die Propidiumjodid-Fluoreszenz unter dem Mikroskop, die Region der neuronalen Schädigung im Bereich des Cornu Ammonis und des Gyrus Dentatus in OHSKs; +MG = 3 Tage nach dem Transfer von 10^5 von BV-2-Mikrogliazellen; + 7-KC = 3 Tage nach Inkubation mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol; +MG+7-KC = 3 Tage nach Inkubation mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol und Transfer von 10^5 BV2-Mikrogliazellen.

Abbildung 4-2 zeigt den neuronalen Zelltod, der in OHSKs nach Zugabe von 10^5 Mikrogliazellen und 10 mg/L 7-Ketocholesterol auftritt. Ein Inkubation der Schnitte für drei Tage mit 7-Ketocholesterol erhöhte das Neuronensterben innerhalb der neuronalen Schichten (granuläre Zellschicht des Gyrus Dentatus und pyramidale Zellschicht des Cornu Ammonis) nur geringfügig. Auch der Transfer von BV-2 Mikrogliazellen allein hatte keine starke Wirkung auf das Absterben der

Neuronen. Durch die Kombination von 7-Ketocholesterol und BV-2-Mikrogliazellen wurde, wie zu erkennen ist, ein deutliches Absterben von Neuronen innerhalb der neuronalen Schichten ausgelöst.

Dass es sich hierbei ausschließlich um Neuronensterben handelt, konnte, wie in **Abbildung 4-3** zu sehen ist, durch eine Färbung mit NeuN nachgewiesen werden. Die Propidium positiven Zellen sind ausschließlich kolokalisiert mit NeuN-positiven Zellen. Darüber hinaus erkennt man an Anfärbung der Neurofilamente im Gyrus Dentatus und Cornu Ammonis außerdem, dass es sich bei den Propidiumjodid gefärbten Zellen um Neuronen handeln muss.

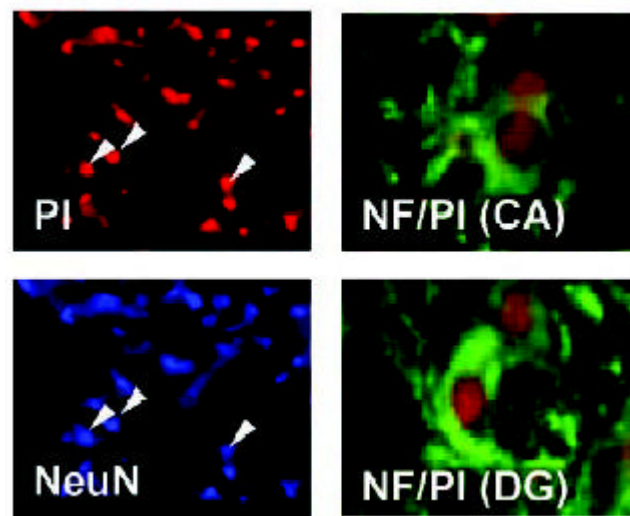


Abb.: 4-3: Neuronaler Zelltod nach Inkubation mit 7-Ketocholesterol und BV-2-Zellen.

Links: Kolokalisation von Propidiumjodid gefärbten Zellen (PI) mit NeuN⁺-Zellen (Pfeile) in den neuronalen Schichten der OHSKs nach Inkubation mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol und Transfer von 10⁵ BV-2-Mikrogliazellen. Rechts: Kolokalisation von Propidiumjodid und Neurofilamentzellen (PI/NF) in den neuronalen Schichten des Gyrus Dentatus (DA) und Cornu Ammonis (CA).

In **Abbildung 4-4** ist die statistische Auswertung der gezählten Propidiumjodid positiven Neuronen im Gyrus Dentatus und Cornu Ammonis zu sehen. Dabei wurden die nicht lebenden Mikrogliazellen, also die, welche PI- und IB₄-positiv waren, abgezogen und die Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle (= 1) dargestellt. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass es nach Zugabe von BV-2 Mikrogliazellen und 7-Ketocholesterol zu einem starken Absterben von Neuronen kommt. Im Vergleich dazu ist die Wirkung von 7-Ketocholesterol bzw. BV-2-Mikrogliazellen alleine nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

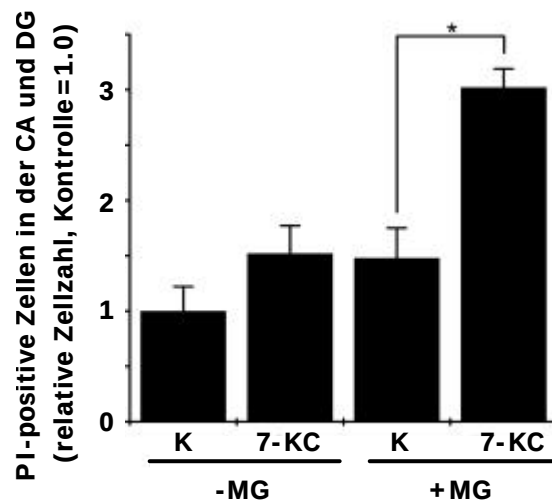


Abb. 4-4: Propidiumjodid positive Zellen in der neuronalen Zellschicht des Cornus Ammonis (CA) und des Gyrus Dentatus (DG) in OHSKs. Die Ergebnisse sind angegeben in relativer Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle ohne Transfer von kultivierten Mikrogliazellen auf die Sliceoberfläche. Nichtlebende Mikrogliazellen (PI^+/IB_4^+) wurden abgezogen. 3 Tage nach Inkubation mit 7-Ketocholesterol (7-KC); $\pm 10^5$ BV-2-Mikrogliazellen.

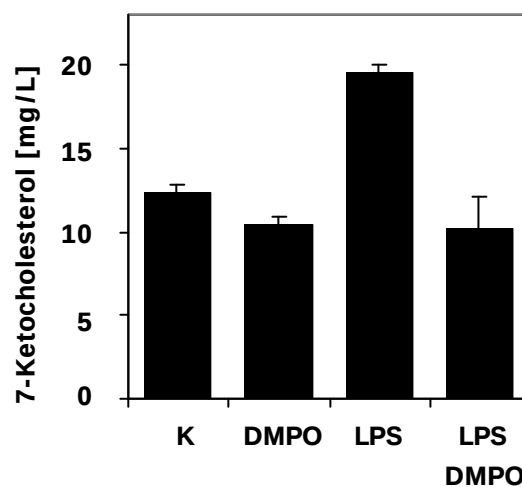


Abb. 4-5: Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die 7-Ketocholesterolkonzentration in OHSKs. Konzentration von 7-Ketocholesterol in lebendem Hirngewebe von OHSKs 4 Stunden nach Transfer von 10^5 BV-2 mikroglialer Zellen mit (LPS) oder ohne (K) vorangegangener LPS Aktivierung oder Inkubation mit 75 mM des extrazellulären Radikalfänger DMPO. Daten sind als MW $\pm$ SD, $n = 6$, $p < 0,005$

Im nächsten Schritt wurden zu den OHSKs, die von nicht aktivierten bzw. LPS-voraktivierten BV-2-Mikrogliazellen unterwandert waren, noch zusätzlich zu dem 7-Ketocholesterol (10 mg/L) der Radikalfänger DMPO gegeben. Die Schnitte wurden hinsichtlich ihrer 7-Ketocholesterolkonzentration untereinander verglichen. Dies ist in **Abbildung 4-5** dargestellt. Dadurch konnte ein Zusammenhang von 7-Ketocholesterol und einer sauerstoffradikal-ähnlichen Wirkung nachgewiesen werden. Eine gleichzeitige Inkubation mit dem freien Radikalfänger DMPO bewirkte insbesondere bei LPS-voraktivierten Mikroglia eine deutliche Suppression der 7-Ketocholesterol-Akkumulation. Eine Inkubation von OHSKs mit nicht aktivierten bzw. LPS-voraktivierten BV-2 Mikroglia und 10 mg/L 7-Ketocholesterol wiesen einen deutlichen Rückgang der Aufnahme von 7-Ketocholesterol bei einer zusätzlichen Behandlung mit 75 mM DMPO auf. Der Effekt war dabei bei einer gleichzeitigen Inkubation mit voraktivierten Mikroglia wesentlich stärker. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass 7-Ketocholesterol im Hirngewebe aus dem oxidativen Angriff von Mikrogliazellen heraus entstehen kann.

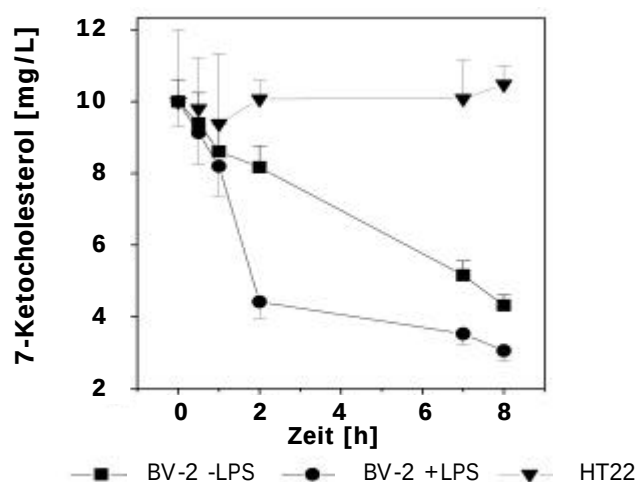


Abb. 4-6: Abbau von 7-Ketocholesterol durch BV-2-Mikrogliazellen, mit und ohne vorangegangener Aktivierung mit LPS, und durch HT22 hippokampale Neuronen, nach Zugabe von 10 mg/L 7-Ketocholesterol. Daten sind angegeben als Konzentration im Überstand der Zellkultur. Daten sind als MW +/- SD angegeben mit n = 6.

Es konnte also gezeigt werden, dass Mikrogliazellen die oxidativ schädigende Wirkung von 7-Ketocholesterol vermitteln. Dies unterstützten die in **Abbildung 4-6** gezeigten Daten. Bei diesem Experiment sollte untersucht werden, inwieweit 7-Ketocholesterol von neuronalen Zellen (HT22), aktivierten bzw. nicht aktivierten Mikrogliazellen (BV-2) abgebaut wird. Auch hier wurden die 7-Ketocholesterolkonzentration wieder mittels Extraktion und HPLC-Analyse bestimmt. (s. 3.2) Es ist deutlich zu sehen, dass HT22 nicht in der Lage sind 7-Ketocholesterol abzubauen, während

besonders LPS voraktivierte Mikroglia dieses intensiv metabolisieren. Das Oxysterol wurde sehr schnell, anscheinend innerhalb der ersten Minuten, in die Zellen aufgenommen und über 8 Stunden stetig abgebaut. Zusätzlich zu der Akkumulation von 7-Ketocholesterol im OHSKs (**Abbildung 4-1**) sind Mikroglia also auch in der Einzelzellkultur in der Lage dieses Oxysterol zu verwerten. Sie können 7-Ketocholesterol sowohl bilden als auch abbauen. Im Gegensatz zu den Experimenten mit den OHSK konnte hier allerdings keine Neubildung bzw. Freisetzung von 7-Ketocholesterol beobachtet werden.

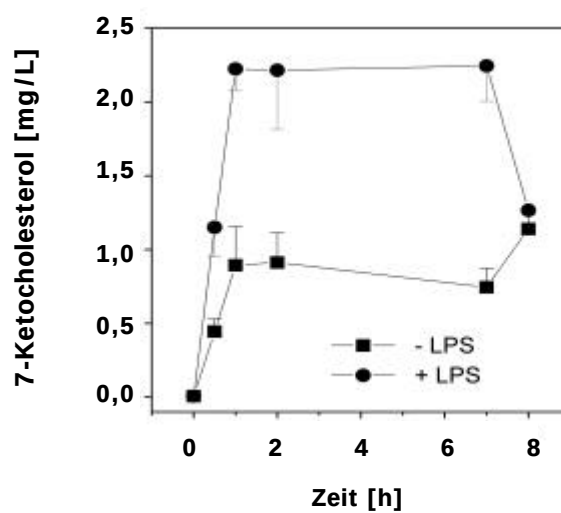


Abb. 4-7: Aufnahme von 7-Ketocholesterol in den Zellkern. Nukleäre Aufnahme von 7-Ketocholesterol in BV-2 Mikrogliazellen mit (+LPS) und ohne (-LPS) vorangegangener LPS Aktivierung, nach Zugabe von 10 mg/L 7-Ketocholesterol. Daten sind als MW +/- SD mit n = 4 gezeigt.

In einem weiteren Experiment wurde die intranukleäre Aufnahme von 7-Ketocholesterol in BV-2 Mikrogliazellen, mit und ohne LPS-Voraktivierung untersucht. Hierfür wurde vor der Extraktion und HPLC-Analyse (s. 3.2.) noch eine Zellkernisolierung (s. 3.7) durchgeführt. In **Abbildung 4-7** sieht man, dass 7-Ketocholesterol in den Zellkern von BV-2-Mikrogliazellen aufgenommen und binnen kürzester Zeit wieder abgebaut wird. Innerhalb von einer Stunde erreichte die 7-Ketocholesterolkonzentration ihren Maximalwert und nahm dann über einen Zeitraum von 8 Stunden wieder ab. In LPS-voraktivierten Zellen war auch hier der Effekt wieder deutlich höher. Man kann also annehmen, dass Mikrogliazellen entweder auch im Zellkern ein System zur Metabolisierung von 7-Ketocholesterol haben und bzw. oder ein Transportsystem, welches ein Gleichgewicht des Cholesterols zwischen Nukleus und Zytosol garantiert.

Um nun noch zu untersuchen inwieweit neuronale und nicht neuronale Zellen an der Freisetzung von 7-Ketocholesterol aus OHSKs nach Einwanderung von Mikrogliazellen beteiligt sind, erfolgte zunächst über 24 Stunden eine zusätzliche Eliminierung der lebenden Neuronen mit NMDA. Das

völlige Absterben der noch lebenden Zellen während einer Behandlung mit 50 μ M NMDA in den neuronalen Schichten wurde durch eine Propidiumjodidfärbung bestätigt (Diestel et al. 2003). Erst dann erfolgte der Transfer von BV-2-Mikrogliazellen. Verglichen wurden hier OHSKs mit (D) und ohne Neuroneneliminierung nach Zugabe von BV-2-Mikrogliazellen und 10 mg/L 7-Ketocholesterol. Dies ist in **Abbildung 4-8** dargestellt. Es konnten nur geringe Unterschiede in der Freisetzung von 7-Ketocholesterol durch die Slices in Abhängigkeit vom Vorhandensein lebender (220 μ g/mg Protein) und nicht lebender Neuronen (185 μ g/mg Protein) beobachtet werden. Man kann somit davon ausgehen, dass die Bildung von 7-Ketocholesterol fast ausschließlich durch nichtneuronale Komponenten, in diesem Falle Mikrogliazellen, erfolgt.

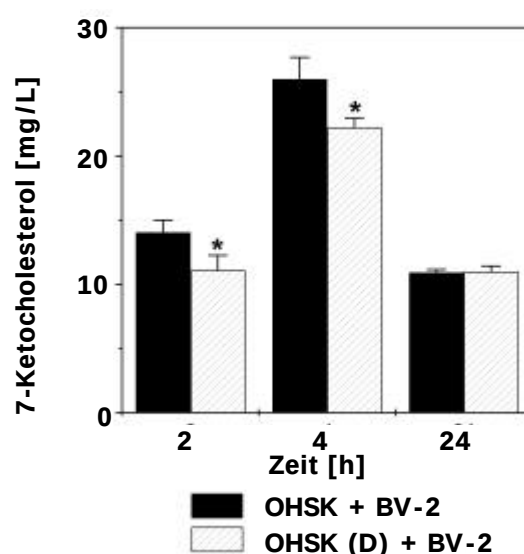


Abb. 4-8: Produktion von 7-Ketocholesterol durch neuronale Komponenten der OHSKs nach Einwanderung von mikroglialen Zellen. Konzentration von 7-Ketocholesterol in OHSKs nach Übertragung von 10^5 LPS aktivierten BV-2 Mikrogliazellen (OHSK). OHSK (D), vorangegangene Eliminierung von lebenden Neuronen durch Inkubation mit 50 μ M NMDA für 24h.

Wie in **Abbildung 4-9** zu sehen ist, geht lediglich ein geringer Anteil des freigesetzten 7-Ketocholesterol auf die Neuronen zurück. Die Analyse (mittels Extraktion und HPLC) der Freisetzung 7-Ketocholesterol durch primäre Neuronen während der Behandlung mit 50 μ M NMDA ergab, dass das gemessene 7-Ketocholesterol (40 μ g/mg Protein) ungefähr dem Unterschied zwischen Slices mit und ohne lebenden Neuronen (**Abbildung 4-8**) entspricht. Damit fällt ein fast zu vernachlässigender Anteil der Ausschüttung von 7-Ketocholesterol auf die Neuronen zurück. Dies ist möglicherweise auf den durch die Mikroglia verursachten oxidativen Stress zurückzuführen.

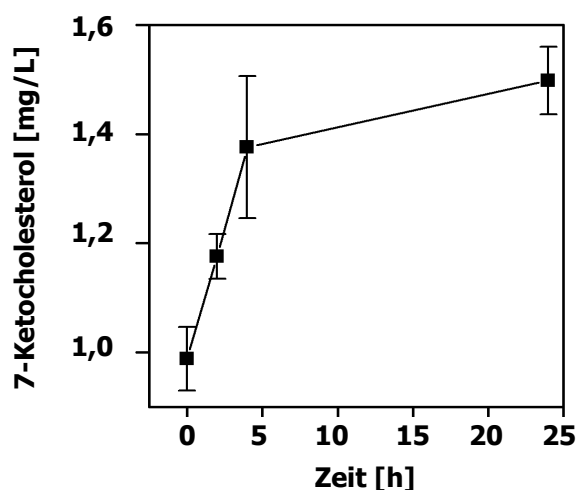


Abb. 4-9: Produktion von 7-Ketocholesterol durch NMDA geschädigte primäre Neuronen. Es wird die Freisetzung von 7-Ketocholesterol in das Kulturmedium nach Induktion von neuralem Schaden durch 50 μ M NMDA gezeigt.

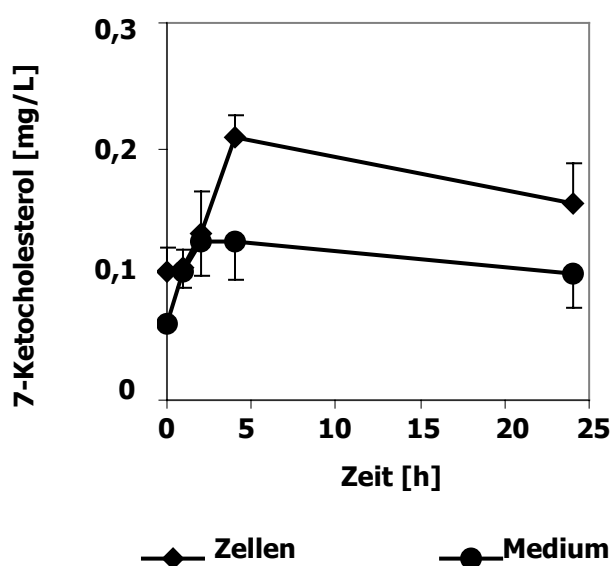


Abb. 4-10: Produktion von 7-Ketocholesterol durch Glutamat-geschädigte hippocampale Neuronen HT22. Zu sehen ist die Freisetzung von 7-Ketocholesterol (bezogen auf 1 g/L Proteine) nach Schädigung mit 20 mM Glutamat. Daten sind als MW $\pm$ SD mit n = 3 gezeigt.

In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung von oxidativem Stress auf Neuronen weiter untersucht, indem hippocampale Neuronen HT22 mit 20 mM Glutamat für 24 Stunden inkubiert und in Abhängigkeit die Freisetzung von 7-Ketocholesterol mittels Extraktion und HPLC-Analyse bestimmt wurden. In **Abbildung 4-10** ist zu erkennen, dass innerhalb der ersten 4 Stunden der Schädigung eine intensive Freisetzung von 7-Ketocholesterol in das überstehende Medium erfolgt,

aber auch in einem noch höheren Maße innerhalb der Neuronen. Wie in **Abbildung 4-11** veranschaulicht führte, im Vergleich zu der Behandlung mit NMDA, die gewählte Glutamatkonzentration nur zum Absterben von 7,5 % der Zellen über 24 Stunden. Die Bestimmung der toten Zellen erfolgte mittels Trypanblaufärbung.

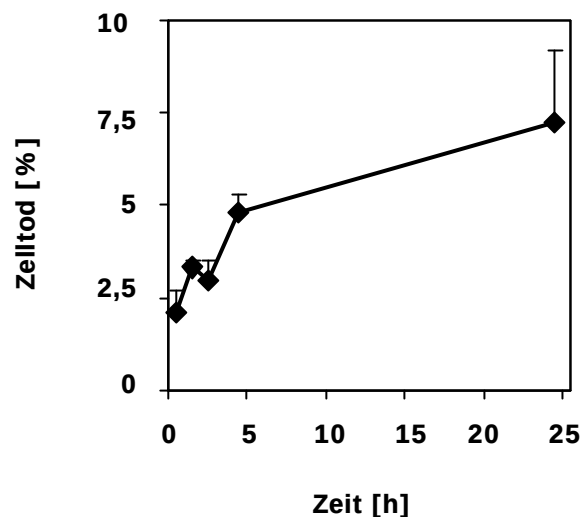


Abb. 4-11: Zelltodrate von durch Glutamat geschädigten HT22 hippocampalen Neuronen. Prozentuales Absterben der Neuronen hervorgerufen durch eine Schädigung mit 20 mM Glutamat. Daten sind als MW $\pm$ SD mit $n = 3$ gezeigt.

In OHSKs wird insbesondere nach Transfer von LPS-voraktivierten Mikroglia 7-Ketocholesterol freigesetzt und abgebaut. Die Behandlung der Schnitte mit Mikroglia und 7-Ketocholesterol in Konzentrationen, wie sie bei MS-Patienten gefunden wurden, bewirkt zum einen ein Absterben von Neuronen und zum anderen eine Akkumulation und Abbau von 7-Ketocholesterol. Dieses Oxysterol kann bei oxidativer Schädigung auch in geringen Mengen von Neuronen freigesetzt werden, wird im OHSK jedoch fast ausschließlich von Mikrogliazellen ausgeschüttet. Diese Zellen sind sogar in der Lage 7-Ketocholesterol in den Zellkern aufzunehmen. Zudem konnte 7-Ketocholesterol eine oxidative Wirkung nachgewiesen werden.

4.2 Akkumulation von 7-Ketocholesterol im ZNS von Multiple-Sklerose-Patienten und während der EAE in der Maus

Die oben gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass fast ausschließlich nicht- neuronale Komponenten an der Freisetzung von 7-Ketocholesterol beteiligt sind. Nachdem nun dieses Oxysterol im Liquor von Multiple-Sklerose-Patienten und im Slice nachgewiesen werden konnte, stellte sich also die Frage: ***Ist 7-Ketocholesterol auch im Gehirn von Multiple-Sklerose-Patienten und im ZNS von EAE-Mäusen messbar und gibt es Unterschiede zwischen der chronischen und akuten Phase?***

4.2.1 7-Ketocholesterol im Gehirn von Multiple-Sklerose-Patienten

Für diese Untersuchungen wurden tiefgefrorene autopsierte Stücke des Gehirngewebes von Patienten mit akuter und chronischer MS (post mortem) hinsichtlich ihrer 7-Ketocholesterolkonzentration untersucht und mit Kontrollgehirnen von Patienten ohne Erkrankungen des ZNS (post mortem) verglichen. Die Bestimmung von 7-Ketocholesterol erfolgte mittels Extraktion und HPLC-Analyse (s. 3.2)

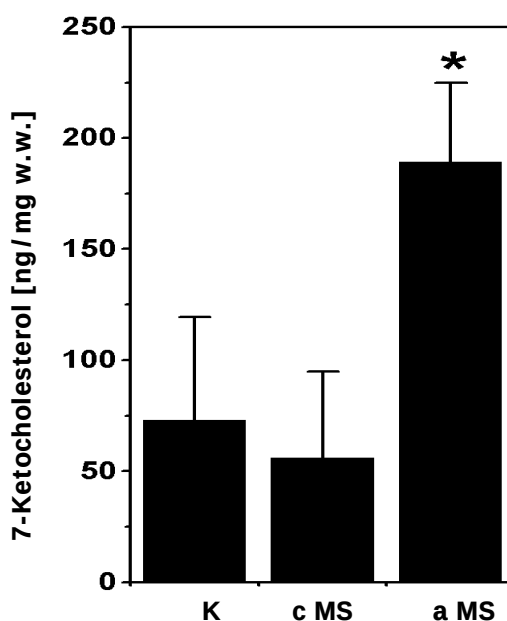


Abb. 4-12: Detektion von 7-Ketocholesterol im Gehirngewebe (weiße Substanz) von MS-Patienten. Die absoluten 7Ketocholesterolkonzentrationen durch HPLC detektiert für Kontrollpatienten (K) und Patienten mit chronischer (cMS) und akuter MS (aMS). Kontrollpatienten: MW = 72,8 +/- ng/mg w.w., n = 6; chronische MS: MW = 55,8 +/- 39,0 ng/mg w.w., n = 6; akute MS: MW = 189,0 +/- 35,7 ng/mg w.w., n = 3, p<0,05.

Das Gewebe der akuten Fälle enthielt nachweislich Läsionen gliotischer Art, an deren Rand es kurz zuvor zu inflammatorischer Aktivität gekommen sein muss. Zusätzlich wurden hier einige frische MS-Läsionen mit Ödemen, mit demyelinisierender Aktivität, reich an inflammatorischen Zellen und zahlreichen hypertrophen Astrozyten, gezeigt. In den Gewebestücken der chronischen Fälle waren stark ebenfalls gliotische und demyelinisierte Läsionen zu beobachten, jedoch mit geringer inflammatorischer Aktivität. Diese Untersuchungen wurden von C. S. Raine am Albert Einstein College of Medicine in New York gemacht.

Abbildung 4-12 zeigt einen Vergleich der 7-Ketocholesterolkonzentration von Patienten mit chronischer und akuter MS mit Patienten ohne Erkrankungen des ZNS. In der weißen Substanz von Patienten mit akuter Multiple Sklerose konnte eine 7-Ketocholesterolkonzentration gemessen werden, welche um das 2,6fache höher war als in der Kontrolle und bei Patienten mit chronischer Multipler Sklerose. Dagegen war in der weißen Substanz von Patienten mit chronischer Multipler Sklerose in der 7-Ketocholesterolkonzentration kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

4.2.2 7-Ketocholesterol während der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

In postmortem-Gehirnen kann es durch Autolyse und Autooxidation zur Bildung von 7-Ketocholesterol kommen. (s. 1.3) Aus diesem Grund wurden daraufhin weitere Untersuchungen an EAE-Mäusen hinsichtlich der 7-Ketocholesterolproduktion durchgeführt und im Zusammenhang mit dem Verlauf der Krankheit betrachtet. EAE ist das T-Zell-vermittelte Tiermodell der RRMS (siehe 1.1 und 1.2). Bei 6-8 Wochen alten SJL-Mäusen erfolgte hier eine Immunisierung mit dem Proteolipid (PLP) 139-151, was anschließend zu einer der schubförmigen MS ähnlichen klinischen Verlaufsform führt. Der Krankheitsverlauf wurde zum einen über den Krankheitsgrad und zum anderen durch Bestimmung des neuronalen Zelltodes mittels Caspasefärbung (s. 3.11) bewertet. Die EAE-Experimente und Caspasefärbungen wurde von O. Aktas (Institut für Neuroimmunologie, klinischer und experimenteller Neuroimmunologie, Universitäts-Krankenhaus Charité, Berlin) durchgeführt. Die 7-Ketocholesterolkonzentrationen wurden über Extraktion und HPLC-Analyse ermittelt (s. 3.2).

Das Modell der EAE erlaubt einen direkten Vergleich von neuronalem Zelltod, Krankheitsgrad (Disease Score) und Freisetzung von 7-Ketocholesterol, was in **Abbildung 4-13** dargestellt ist. Der Disease Score wird wie folgt definiert: 0...nicht krank, 1...geschwächter Schwanz, 2...teilweise gelähmte hintere Extremitäten, 3...vollständige Lähmung der hinteren Extremitäten, 4...vollständige

Lähmung der hinteren Extremität und geschwächte vordere Extremitäten oder komplette Lähmung, 5...Tiere sterbend oder tot (Raine 1984).

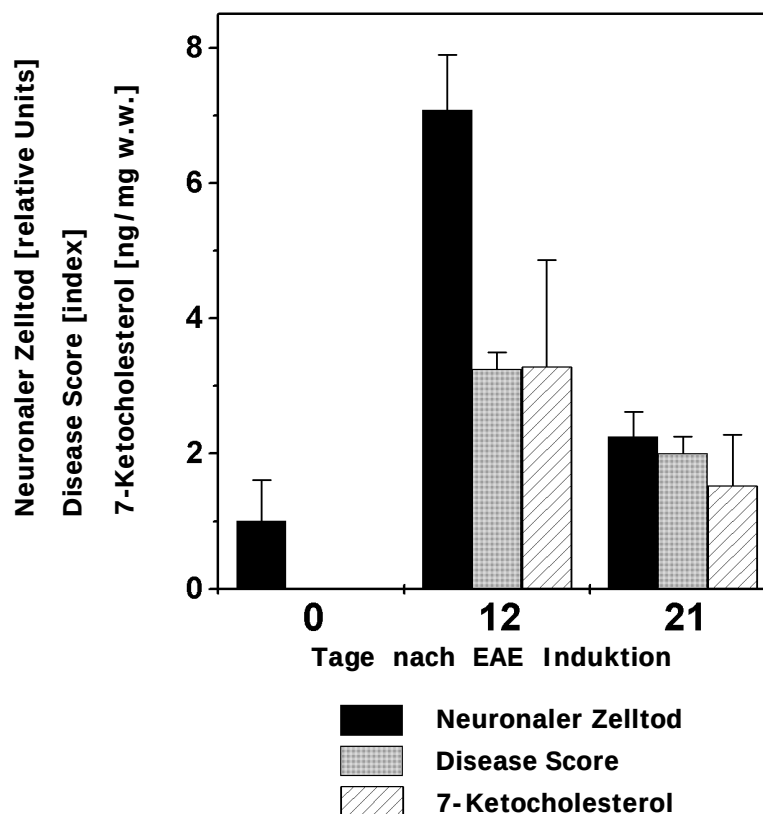


Abb. 4-13: Konzentration von 7-Ketocholesterol und neuronaler Zelltod im motorischen Bereich des Hirnstammes und klinischer Disease Score während des Verlaufs der EAE. 7-Ketocholesterolkonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt und die relative Höhe von aktiven Caspase-3⁺-Neuronen werden gezeigt. Der klinische Disease Score wurde nach Broke et al (1993) bestimmt.

Im Krankheitsverlauf der EAE erfolgte ein zeitgleicher Anstieg von 7-Ketocholesterol, Disease Score und Zelltoderate im motorischen Bereich des Hirnstammes. Alle drei Parameter erreichten auf dem Höhepunkt der Krankheit, welche sich durch starke motorische Beeinträchtigung zeigte, ihr Maximum. Eine Erhöhung von 7-Ketocholesterol erfolgte hauptsächlich in den Bereichen des Gehirns, die direkt von der EAE betroffen waren. So betrug die 7-Ketocholesterol-Konzentration im motorischen Bereich des Hirnstammes 4,14 $\pm$ 0,71 ng/mg Frischmasse (w.w.), während im nicht beeinflussten Kortex nur 1,48 $\pm$ 0,16 ng/mg Frischmasse 7-Ketocholesterol zu messen waren. Im Anschluss kam es während der klinischen Remissionsphase zu einem Absinken von Zelltoderate, Disease Score und 7-Ketocholesterol.

7-Ketocholesterol wird also sowohl während der MS als auch während der EAE freigesetzt. EAE-Tiere, bei denen keine vollständige Remissionsphase, sondern langfristige neurologische Schäden zu beobachten waren, hatten weiterhin eine erhöhte Konzentration von 7-Ketocholesterol. Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um einen Kreislauf selbsterhaltender chronischer Inflammation handelt, bei der 7-Ketocholesterol immer wieder freigesetzt wird.

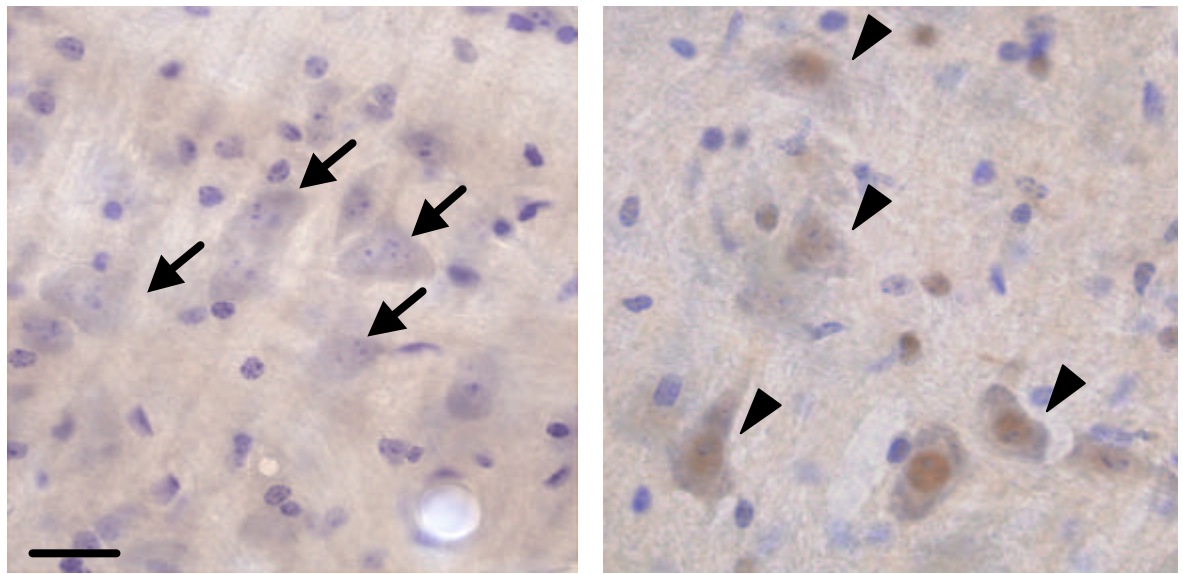


Abb. 4-14: Aktive Caspase-3⁺-Neuronen im motorischen Bereich des Hirnstammes. Sektionen wurden mit Nissel-Färbung gegengefärbt. Neuronen werden als Kontrolle (links,  Tag 0) und als klinischer Höhepunkt der EAE (rechts,  Tag 12) gezeigt. Balken entspricht 20 µm.

Abbildung 4-14 zeigt noch einmal die Caspase3-Färbung mit Nissel-Gegenfärbung in den Hirnstammregionen der EAE-Mäuse, wie sie für die Bestimmung des neuronalen Zelltodes verwendet wurde. Es ist ein eindeutiger Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 12 - dem klinischen Höhepunkt der EAE - zu erkennen. Auf dem Höhepunkt der EAE war ein deutlicher neuronaler Zelltod zu verzeichnen.

7-Ketocholesterol wird während der akuten Phase in der weißen Substanz von Multiple-Sklerose-Patienten und im motorischen Bereich des Hirnstammes von EAE-Mäusen auf dem Höhepunkt der Krankheit freigesetzt. Es kommt zu einem Rückgang der 7-Ketocholesterolkonzentration in der chronischen Phase von Multipler Sklerose und in der Remissionsphase der EAE. Während der EAE geht der Anstieg der 7-Ketocholesterolkonzentration mit einem gesteigerten neuronalen Zelltod einher.

4.3 Oxysterolinduzierte Botenstoffe

Mikroglia sind an vielen Immunreaktionen beteiligt. Dafür stehen ihnen eine Vielzahl verschiedenster Mediatoren zur Verfügung, welche eine Wechselwirkung zwischen den einzelnen Geweben ermöglichen. Diese wird unter anderem von Zytokinen und Chemokinen vermittelt (Kreuzberg 1996, Hanisch 1996).

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass Mikroglia stark an der durch Oxysterole vermittelten Schädigung von Neuronen beteiligt sind. Es stellt sich also hier als nächstes die Frage:

Welche Signalstoffe werden in Mikroglia durch Oxysterole, insbesondere 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol, ausgeschüttet?

4.3.1 Auswirkung von Oxysterolen auf Zytokine

Es erfolgte zunächst die Untersuchung von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen, die besonders relevant bei mikroglial vermittelter Neuronenschädigung sind und bei Multipler Sklerose eine wichtige Rolle spielen. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β und das Chemokin MCP-1 gelegt. 25-Hydroxycholesterol wurde bei den GC/MS-Analysen des Liquors von MS-Patienten (Diestel et al. 2003) neben 7-Ketocholesterol ebenfalls erhöht vorgefunden (Daten nicht veröffentlicht). Es konnte jedoch auf Grund der ungenügenden Empfindlichkeit der HPLC-Methode (Kritharides et al. 1993) für dieses Oxysterol bei den oben dargestellten Untersuchungen nicht untersucht werden. Deshalb wurde es erst an dieser Stelle in die Betrachtungen mit einbezogen. Hierfür wurden BV-2-Mikrogliazellen mit 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol (10 mg/L) behandelt und die Zytokine bzw. Chemokine mittels ELISA-Test (s. 3.6) in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

IL-1 β lag in so geringer Menge vor, dass es mittels ELISA nicht nachgewiesen werden konnte. Darum können hier keine verwertbaren Daten gezeigt werden. **Abbildung 4-15** zeigt den Einfluss von 7-Ketocholesterol auf die Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10 und das Chemokin MCP-1. Für TNF- α konnte über einen Zeitraum von 48 Stunden für beide Oxysterole ein deutlicher Anstieg - mit einer Signifikanz von $p < 0,002$ - verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu war IL-6 nur durch Exposition mit 25-Hydroxycholesterol in gesteigerten Konzentrationen zu finden. Die Konzentration von IL-10 verringerte sich über den gleichen Zeitraum, wobei auch hier der Effekt für 25-Hydroxycholesterol stärker war als für 7-Ketocholesterol. Mit $p < 0,05$ war dieses Ergebnis eindeutig. 25-Hydroxycholesterol bewirkte bei dem Chemokin MCP-1 ebenfalls ein deutliches Absinken, während 7-Ketocholesterol auch hier keinerlei Einfluss hatte. In **Tabelle 4-1** ist noch einmal eine

Zusammenfassung zur Freisetzung der verschiedenen Zytokine und Chemokine dargestellt. Eine mitgeführte Cholesterolkontrolle zeigte keinen messbaren Effekt auf die Zytokine. Dass heißt die Werte lagen außerhalb des Detektionsbereiches der Methode und sind deshalb hier nicht mit dargestellt.

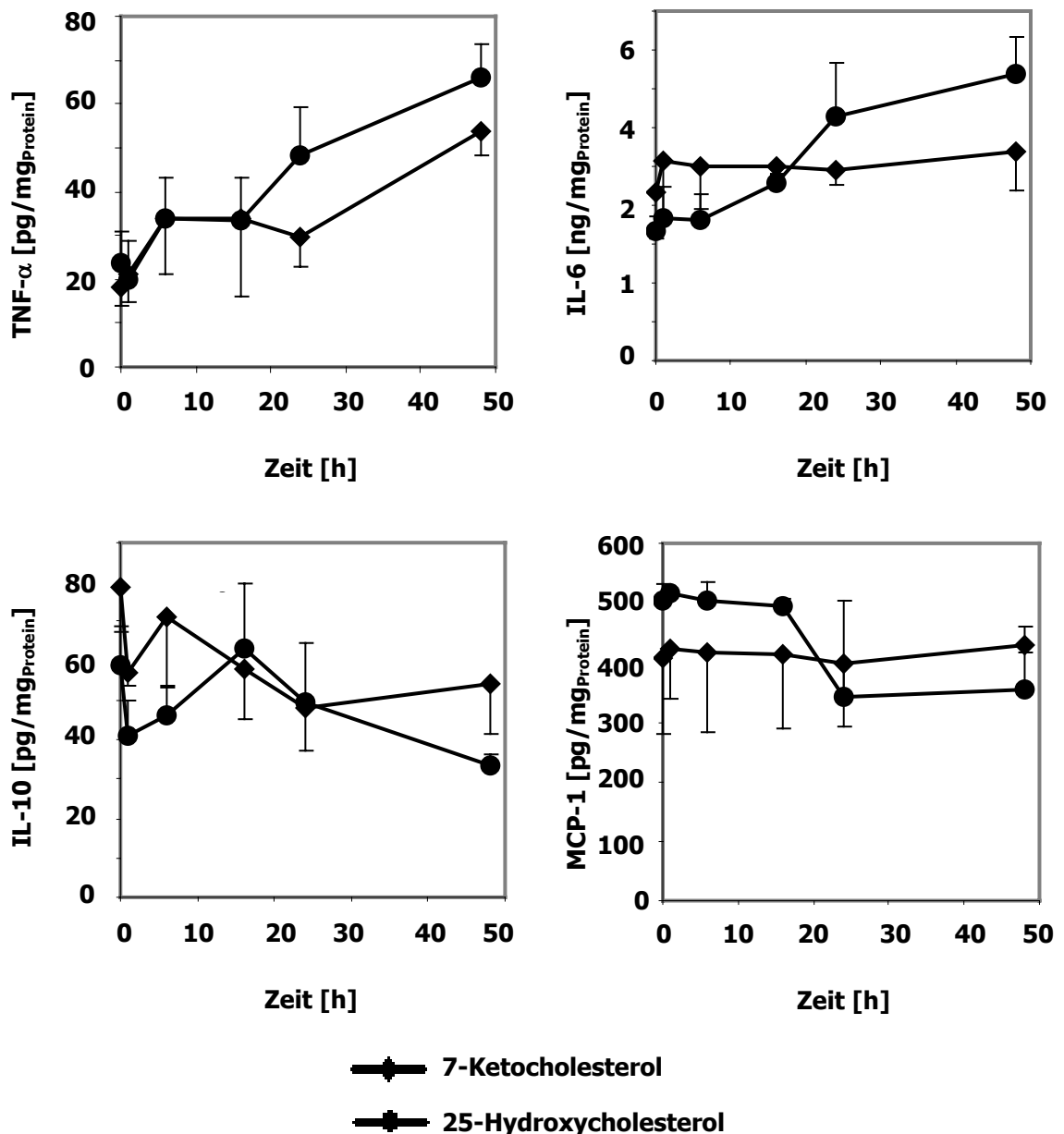


Abb. 4-15: Zytokininduktion nach 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol Exposition. In BV-2-Mikrogliazellen wurde nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol die Ausschüttung der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10 und des Chemokins MCP-1 gemessen. Daten sind als MW $\pm$ SD angegeben und n = 4. Angaben für TNF- α , IL-10 und MCP-1 in pg/mg Protein, für IL-6 in ng/mg Protein.

Tabelle 4-1: Kurzübersicht über den Einfluss von 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol auf die verschiedenen Zytokine und Chemokine

	7-Ketocholesterol	25-Hydroxycholesterol
TNF- α		
IL-6		
IL-10		
MCP-1		

4.3.2 Zusammenhang zwischen Oxysterolen und nitrosativem Stress

Unter inflammatorischen Bedingungen sind Mikroglia in der Lage neben Zytokinen und Chemokinen auch Stickstoffoxid freizusetzen und in diesem Zusammenhang fähig die iNOS Expression zu induzieren. Deshalb wurde unter diesem Gesichtspunkt zunächst die Bildung von NO während der Inkubation von BV-2-Mikroglia mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol, 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol über einen Zeitraum von 48 Stunden mittels Griess-Assay (s. 3.3) gemessen. **Abbildung 4-16** zeigt, dass es während der Exposition mit 25-Hydroxycholesterol über 24 Stunden zu einem deutlichen Anstieg ($p < 0,0001$) in der Konzentration von Nitritoxid kommt. Für 7-Ketocholesterol konnte ein leichter Anstieg in der NO-Konzentration beobachtet werden, der jedoch nicht signifikant war. Die Kontrolle mit Cholesterol wies über den Zeitraum von 48 Stunden ebenfalls keine Veränderung des NO-Gehaltes auf.

Daraufhin wurde die Expression der iNOS, welche für die Bildung von NO verantwortlich ist, nach Exposition von BV-2 Mikrogliazellen mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol, 25-Hydroxycholesterol und Cholesterol als Kontrolle mittels Western-Blot-Methode untersucht. Wie in **Abbildung 4-17** zu erkennen ist, wies Cholesterol keine iNOS-Expression auf. 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol hingegen induzierten eine gesteigerte Expression schon nach 1 Stunde bzw. nach 30 Minuten. Während der Inkubation mit 7-Ketocholesterol nahm die Konzentration der iNOS über einen Zeitraum von 6 Stunden weiterhin zu. Bei Behandlung mit 25-Hydroxycholesterol war hingegen nach 4 Stunden schon ein Rückgang der iNOS-Expression zu verzeichnen. Auch hier konnte wieder für dieses Oxysterol ein stärkerer Effekt verzeichnet werden. Dies mag mit der bekanntermaßen höheren Toxizität von 25-Hydroxycholesterol einhergehen (s. 1.3).

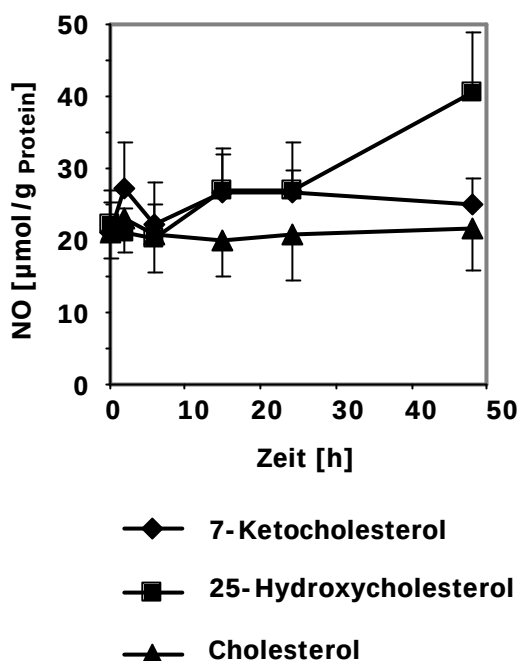
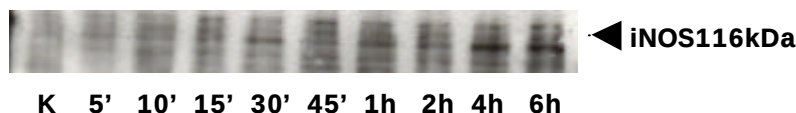


Abb. 4-16: NO-Ausschüttung induziert durch 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxy-cholesterol. In BV-2-Mikrogliazellen wurde die Ausschüttung von NO während 48 Stunden Exposition mit jeweils 10 mg/L 7-Ketocholesterol, 25-Hydroxycholesterol und Cholesterol (als Kontrolle) gemessen. Daten sind als MW +/- SD und n = 6 angegeben.

7-Ketocholesterol [10μg/mL]



25-Hydroxycholesterol [10μg/mL]



Cholesterol [10μg/mL]

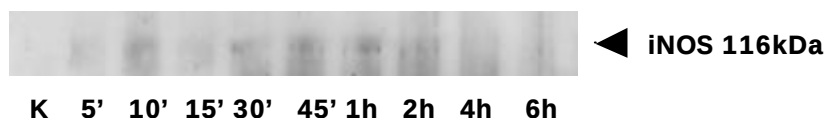


Abb. 4-17: Induktion der iNOS durch 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol. Die Expression der iNOS wurde nach Exposition von BV-2-Mikroglia mit jeweils 10 mg/L 7-Ketocholesterol, 25-Hydroxycholesterol und Cholesterol (als Kontrolle) mittels Western Blot Analyse bestimmt.

Dass 25-Hydroxycholesterol eine stärkere Reaktion in den Zellen hervorruft, konnte auch mittels MTT-Aktivitäts-Test verdeutlicht werden. BV-2-Mikrogliazellen wurden mit jeweils 10 mg/L 25-Hydroxycholesterol, 7-Ketocholesterol bzw. Cholesterol behandelt. Hier konnte man deutlich erkennen, dass 25-Hydroxycholesterol toxischer ist als 7-Ketocholesterol oder Cholesterol. Es sollte aber beachtet werden, dass MTT eine Methode der Vitalitätsmessung ist, welche sich nur auf lebende Zellen bezieht (s. 3.4.1). In **Abbildung 4-18** ist zu erkennen, dass BV-2-Mikrogliazellen, die mit 10 mg/L 25-Hydroxycholesterol inkubiert wurden, über einen Zeitraum von 48 Stunden ca. 60 % ihrer Ausgangsaktivität ($p < 0,0001$) verloren. Im Gegensatz dazu konnte nach Behandlung mit Cholesterol oder 7-Ketocholesterol keine veränderte MTT-Aktivität gemessen werden. Für 7-Ketocholesterol wurde zwar ein leichter Rückgang der MTT-Aktivität beobachtet, jedoch erwies sich dieser als nicht eindeutig.

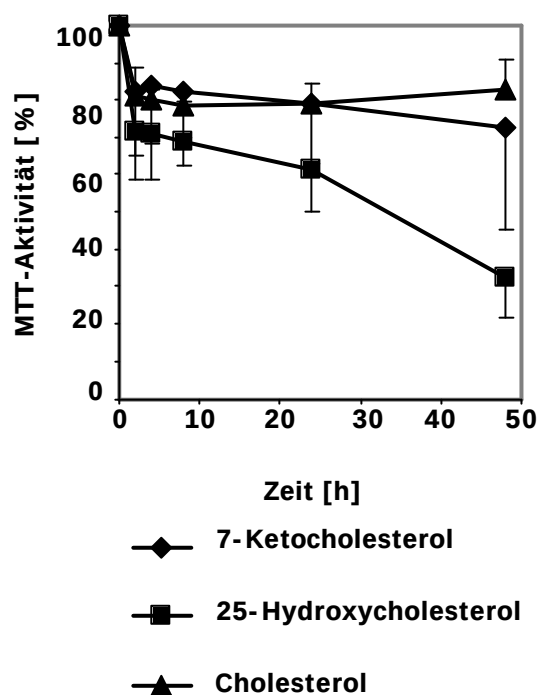


Abb. 4-18: Einfluss von 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol auf die MTT-Aktivität. Messung der MTT-Aktivität über 48 Stunden während der Exposition mit jeweils 10 mg/L 7-Ketocholesterol, 25-Hydroxycholesterol und Cholesterol (als Kontrolle). Daten sind als MW $\pm$ SD und $n = 5$ angegeben.

Da mittels MTT-Test 7-Ketocholesterol keine signifikante Toxizität auf BV-2 Mikrogliazellen nachgewiesen werden konnte, erfolgte zusätzlich noch eine Zelltodbestimmung mittels Trypanblaufärbung. Hierbei zeigte 7-Ketocholesterol über 8 Stunden eine maximale Letalität von ca. 16 %. Dies ist in **Abbildung 4-19** dargestellt.

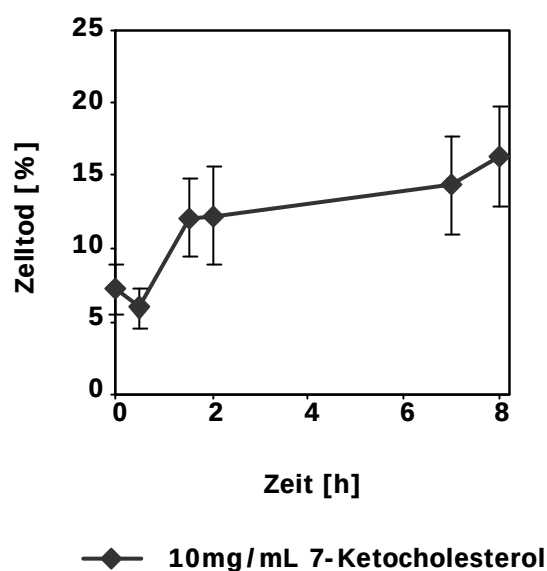


Abb. 4-19: Zelltod nach Exposition mit 7-Ketocholesterol. Gemessene prozentuale Zelltodrate bei BV-2 Mikrogliazellen mittels Trypanblaufärbung nach 10 mg/L 7-Ketocholesterol. Daten als MW +/- SD und n = 6 angegeben, p < 0,0001.

In BV-2 Mikrogliazellen wird nach Exposition mit 7-Ketocholesterol in einer Konzentration, wie sie bei Multiple Sklerose Patienten zu finden ist, die Expression von TNF- α hoch- und von IL-10 herunterreguliert. Nach Exposition mit 25-Hydroxycholesterol kommt es zusätzlich zu einer Hochregulation von TNF- α und IL-6 sowie zu einer Herunterregulierung von IL-10 und MCP-1 und einer NO Ausschüttung. Beide Oxysterole bewirken eine gesteigerte iNOS-Expression.

4.4 Oxysterol induzierte Signalwege

Die verschiedenen untersuchten Botenstoffe spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung bestimmter Signalwege. Sie sind aber auch verantwortlich für die Sekretion der jeweiligen Zytokine, Chemokine und RNS / ROS. Es galt also nun auch noch zu klären: **Welche Signalwege werden nach der Bildung von 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol beeinflusst?**

4.4.1 MAP-Kinasen in Oxysterol-Signalwegen

Durch verschiedene Stressstimuli wie zum Beispiel reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale oder Zytokine kann es zur Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK / SAPK kommen. Aber auch eine Involvement der mitogen-stimulierten ERK1/2 MAP-Kinase und der Transkriptionsfaktoren CREB und Elk-1 ist möglich. Häufig sind diesen Kinasen die MAP-Kinase-Kinasen MEK1 und MEK2 vorgeschaltet. Die Aktivierung dieser Proteinkinasen zeigt sich durch ihren Phosphorylierungsgrad. Die phosphorylierten Kinasen sind mittels spezifischer Antikörper über die Western Blot Methode nachweisbar. BV-2-Mikrogliazellen wurden hierfür mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol, 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol behandelt und nach verschiedenen Zeitpunkten von 0-15 Stunden geerntet, lysiert und das Lysat mittels Western-Blot-Methode auf die verschiedenen Kinasen und Transkriptionsfaktoren hin untersucht.

Die **Abbildungen 4-20 und 4-21** ist die zeitabhängige Phosphorylierung der Proteinkinasen MEK1/2, ERK1/2, p38, SAPK/JNK, CREB und Elk-1 nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol dargestellt.

Die MAP-Kinase-Kinase MEK1 erlangte schon in den ersten Minuten der 7-Ketocholesterol-Exposition eine deutlich erhöhte Phosphorylierung, welche nach sechs Stunden wieder zurückging. Bei MEK2 begann die Phosphorylierung nach ca. 30 Minuten und zeigte nach einer Stunde ein Maximum. Nach 15 Stunden nahm die Intensität der Phosphorylierung auch hier wieder ab. Für 25-Hydroxycholesterol konnte bei beiden Kinasen eine kontinuierliche Phosphorylierung über 15 Stunden beobachtet werden.

Bei den beiden MAPK ERK1 und ERK2 hatte 7Ketocholesterol auf ERK1 den stärkeren Effekt beginnend bei 15 Minuten und einer maximalen Intensität nach einer Stunde. Ein ähnlicher, aber deutlich schwächerer Effekt war bei ERK2 zu erkennen. 25-Hydroxycholesterol bewirkte keinerlei Unterschiede zwischen ERK1 und ERK2. Auch hier wurde nach 15 Minuten ein Phosphorylierungsbeginn beobachtet. Die maximale Intensität war nach einer Stunde zu sehen.

Nach 15-stündiger Inkubation der BV-2-Mikrogliazellen mit den beiden Oxysterolen hatte die Bandenstärke für p-ERK1/2 wieder die der Kontrolle angenommen.

Auch auf die MAPK p38 hatte 10 mg/L 7-Ketocholesterol eine Wirkung. Hier kam es über eine Stunde zu einer kontinuierlichen Phosphorylierung, die danach zurück auf die Bandenstärke der Kontrolle ging. Für diese MAPK konnte nach Exposition mit 10 mg/L 25-Hydroxycholesterol ab 30 Minuten ein kontinuierlicher Anstieg der Phosphorylierung, welche über einen Zeitraum von 15 Stunden nicht weniger wurde, beobachtet werden.

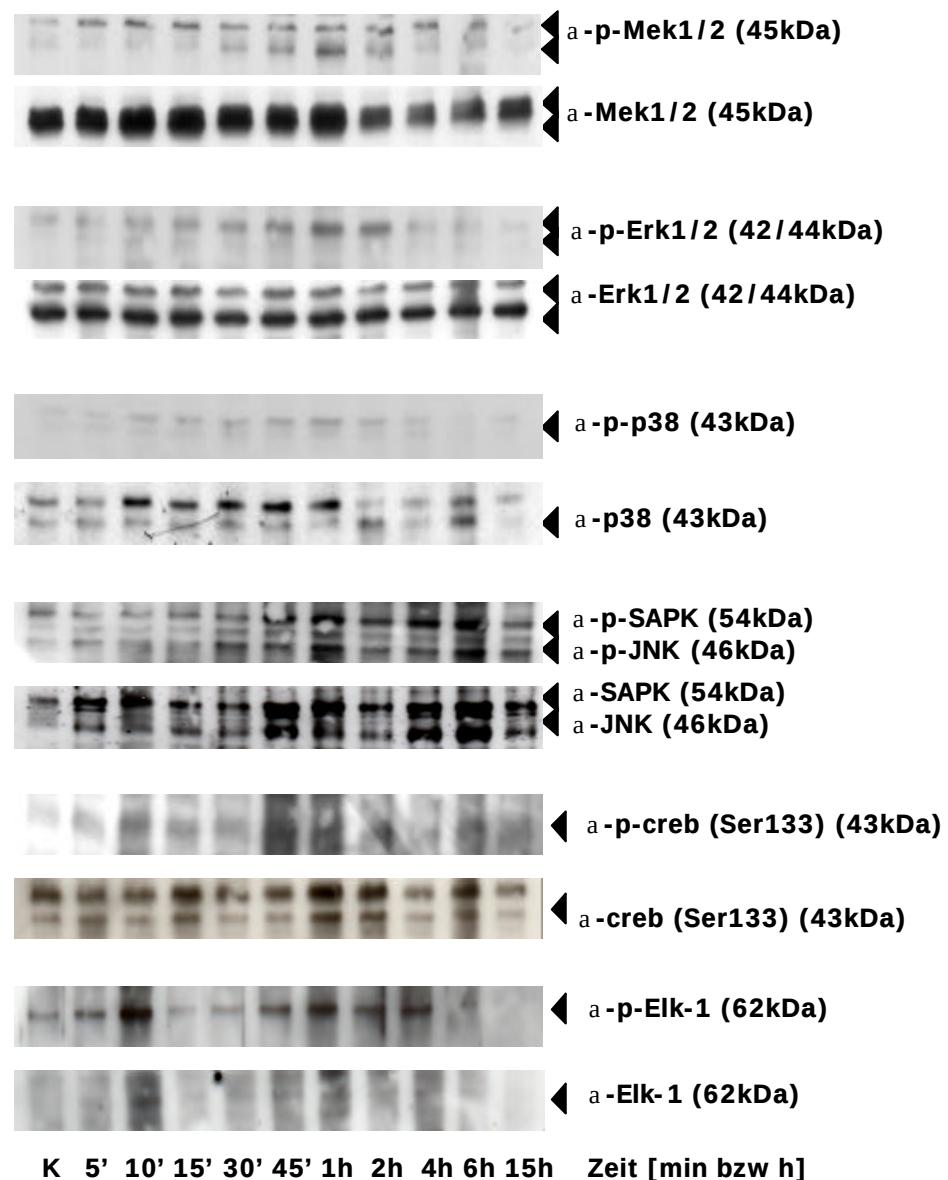


Abb. 4-20: 7-Ketocholesterol induzierte Aktivität verschiedener MAP-Kinasen. Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen MEK 1/2, ERK 1/2, p38, SAPK / JNK und ELK-1 nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol.

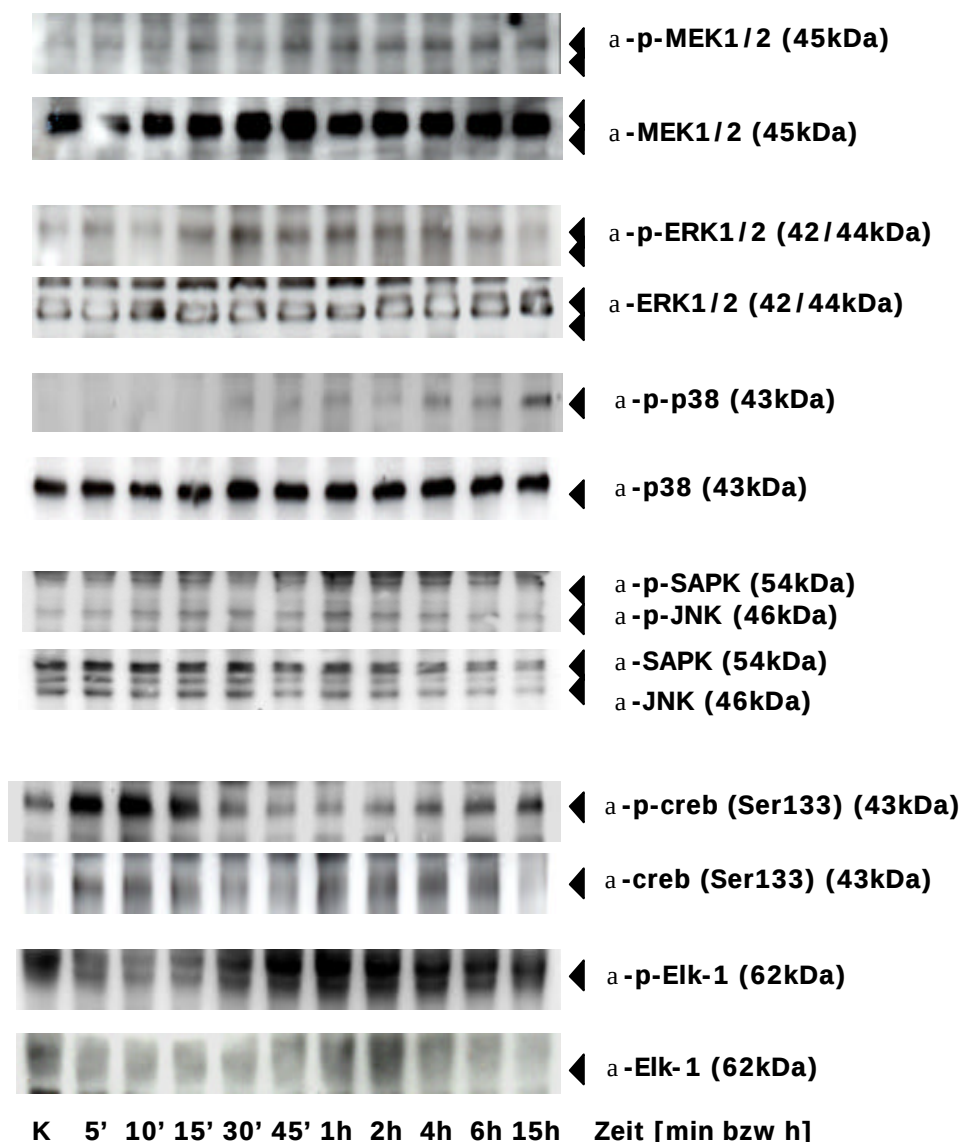


Abb. 4-21: 25-Hydroxycholesterol induziert die Aktivität verschiedener MAP-Kinasen. Betrachtung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen MEK 1/2, ERK 1/2, p38, SAPK / JNK, CREB, und ELK-1 nach Exposition mit 10 mg/L 25-Hydroxycholesterol.

Nach Exposition von BV-2 Mikrogliazellen mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol nahm die Phosphorylierung der MAP-Kinasen SAPK und JNK bis zu einer Stunde deutlich zu und ging erst nach 6 Stunden wieder leicht zurück. Ähnlich war es auch nach Behandlung mit 10 mg/L 25-Hydroxycholesterol. Es konnten jedoch hier Unterschiede zwischen SAPK und JNK beobachtet werden. Beide erreichten nach einer Stunde den höchsten Phosphorylierungsgrad. Bei JNK

verringerte sich die Phosphorylierung unmittelbar danach wieder, bis sie nach 15 Stunden wieder der Kontrolle entsprach. Bei mit 25-Hydroxycholesterol behandelten Zellen ging die Phosphorylierung von SAPK, dagegen erst nach 6 bis 15 Stunden wieder zurück.

Auf den Transkriptionsfaktor CREB hatte nur 10 mg/L 25-Hydroxycholesterol eine Wirkung. Hier nahm die Phosphorylierung über einen Zeitraum von 15 Stunden kontinuierlich zu. Nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol konnte keinerlei Effekt auf diesen Transkriptionsfaktor beobachtet werden.

Auch für den Transkriptionsfaktor Elk-1 kam es nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol bis zu einer Stunde zu einer deutlichen Phosphorylierung, welche im Anschluss wieder zurück ging. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass das unphosphorylierte Elk-1 kaum nachzuweisen war.

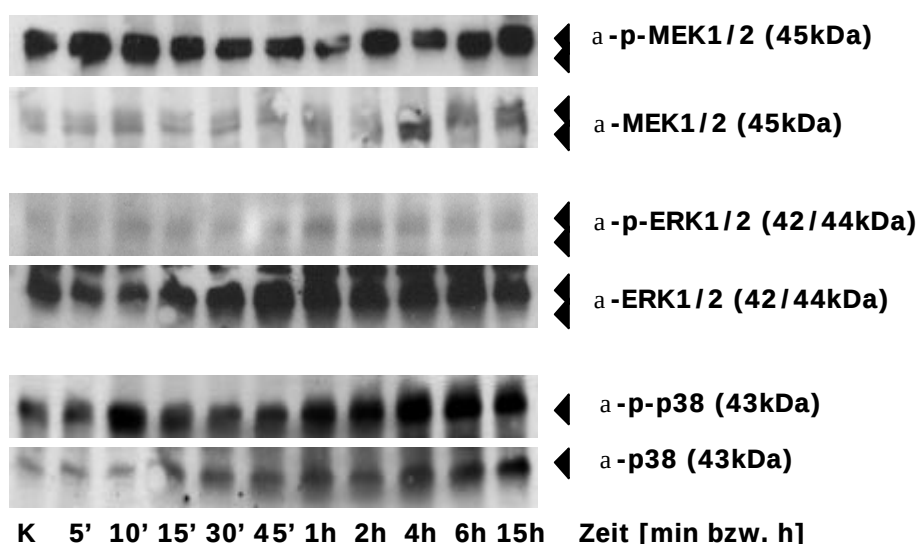


Abb. 4-22: Einfluss von Cholesterol auf MAP-Kinasen. Negativ-Kontrolle des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen MEK 1/2, ERK 1/2 und p38 bei 10mg/L Cholesterol.

Die Proteinkinasen MEK1/2, ERK1/2 und p38 wurden zusätzlich als Kontrolle hinsichtlich ihres Phosphorylierungsgrades nach Exposition mit 10 mg/L Cholesterol untersucht und sind in **Abbildung 4-22** dargestellt. Cholesterol hatte auf alle drei Kinasen keinerlei Einfluss.

4.4.2 Aktivierung der PARP-1 durch 7-Ketocholesterol

Mikrogliale Aktivierung über 7-Ketocholesterol ist durch die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie einer Aktivierung der PARP-1 im Zellkern begleitet (Diestel et al. 2003). In inflammatorischen Zellen spielt die PARP eine wichtige Rolle als Co-Aktivator während der Aktivierung von NF- κ B (s. 1.4).

4.4.2.1 PARP-1 Aktivität durch 7-Ketocholesterol in Zellkernen von BV-2 Mikroglia

In **Abbildung 4-7** ist zu erkennen, dass 7-Ketocholesterol von BV-2-Mikroglia, mit und ohne LPS-Stimulierung, innerhalb einer Stunde in den Zellkern aufgenommen wird. Die maximale 7-Ketocholesterol-Konzentration im Zellkern betrug bei aktivierten Mikroglia ungefähr 2 mg/L. Diese Konzentration wurde eingesetzt um nun weitere Untersuchungen durchzuführen im Hinblick auf die Wirkung von 7-Ketocholesterol im Zellkern und auf die PARP-1.

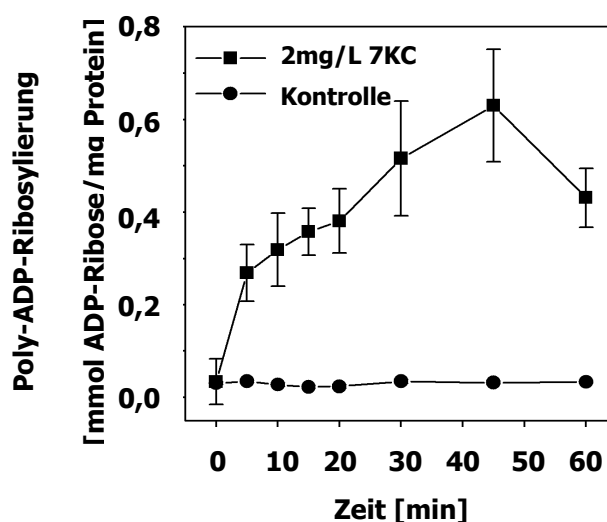


Abb. 4-23: PARP-Aktivität in isolierten Zellkernen von BV-2 Mikrogliazellen nach Inkubation mit 2 mg/L 7-Ketocholesterol oder mit entsprechender Kontrolle. Die Aktivität der Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde mittels Aufnahme von 32 P-gelabelten NAD^+ in die nukleären Proteine bestimmt. Daten sind als MW $\pm$ SD angegeben, n = 6

Hierfür wurden isolierte Zellkerne von BV-2-Mikrogliazellen mit der entsprechenden Menge von exogenem 7-Ketocholesterol (2 mg/L) inkubiert und ein Zeitdiagramm von einer Stunde aufgenommen. Die PARP-Aktivität wurde über den Einbau von 32 P-gelabelten NAD^+ in die nukleären Proteine gemessen. In **Abbildung 4-23** ist zu sehen, dass es zu einem sofortigen und deutlichen Anstieg der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in den Zellkernen kommt. Die gemessenen PARP-Aktivität stieg schon nach wenigen Minuten signifikant an und erreichte nach 45 Minuten ihren

maximalen Wert. Nachfolgend kam es wieder zu einer Abnahme der Aktivität. Die Kontrolle, welche als Startreagenz nur das Lösungsmittel von 7-Ketocholesterol enthielt, hatte keinerlei Effekt.

4.4.2.2 Wirkung von 7-Ketocholesterol auf rekombinante PARP-1

Um nun noch genauer zu untersuchen inwieweit die PARP-1 mit 7-Ketocholesterol interagiert, wurde isolierte rekombinante PARP mit 7-Ketocholesterol und nativer DNA, nur 7-Ketocholesterol, sonifizierter DNA bzw. nativer DNA inkubiert. Wie in **Abbildung 4-24** zu erkennen, zeigte sich, dass 7-Ketocholesterol allein nicht in der Lage war die PARP zu aktivieren. Genauso hatte native DNA keine Auswirkung auf die PARP-Aktivität. Bei Inkubation sonifizierter DNA mit der PARP erfolgte, wie zu erwarten, eine sehr schnelle Aktivierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Innerhalb der ersten 20 Minuten erreichte die PARP-Aktivität ihren Maximalwert. Ein Reaktionsansatz von rekombinanter PARP, 7-Ketocholesterol und nativer DNA zeigt nach einer zehnminütigen Lag-Phase ebenfalls eine Aktivierung der PARP und erreichte zuletzt fast den Aktivierungsgrad, der durch sonifizierte DNA hervorgerufen wurde. Es ist also anzunehmen, dass 7-Ketocholesterol die PARP-1 über DNA-Modifizierung aktiviert.

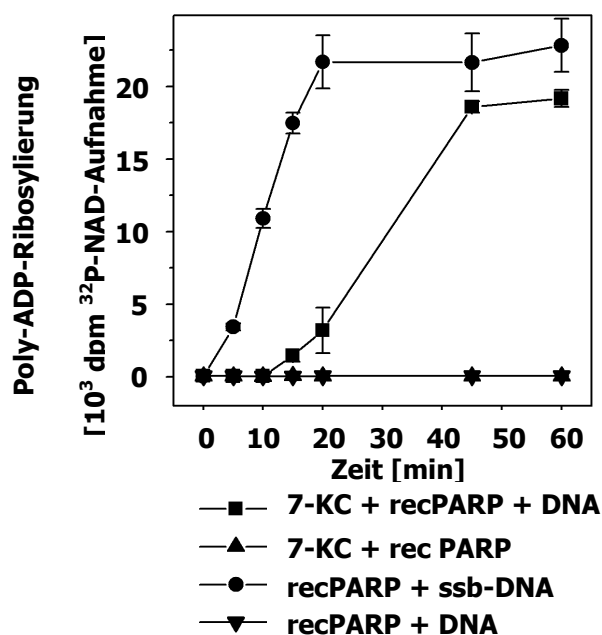


Abb. 4-24: DNA-abhängige Aktivierung rekombinanter PARP (recPARP) durch 7-Ketocholesterol. Rekombinate PARP wurde mit 2 mg/L 7-Ketocholesterol in Anwesenheit nativer DNA (DNA) oder ssb-DNA (sonified single strand break DNA) inkubiert. Aktivität der Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde über die Aufnahme von ^{32}P -gelabelten NAD^+ in das nukleäre Protein gemessen. Werte sind als MW gegeben $\pm$ SD, $n = 9$.

4.4.3 Mikro-Array-Genexpression in 7-Ketocholesterol stimulierten BV-2-Mikrogliazellen

Aus BV-2 Mikrogliazellen, welche mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol behandelt wurde, erfolgt nach 0, 0,5, 2 und 4 Stunden eine Isolierung der RNA. Von diesen Proben wurde die Expression der Gene durch ein DNA-Mikro-Array bestimmt. Die **Tabellen 4-6** und **4-7** zeigen alle Gene, die nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol um den Logarithmus von mindestens zwei hoch- bzw. herunterreguliert wurden, mit einer entsprechen Unterteilung in die Hauptfunktionsbereiche. Die Auflistung erfolgte hier absteigend, mit dem am stärksten hoch bzw. runterregulierten Gen in den jeweiligen Kategorien beginnend. Die Ausrichtung wurde anhand des Vierstundenwertes festgelegt. Zusätzlich sind in **Tabelle 4-2** und **Tabelle 4-4** noch die ersten 20 hoch- bzw. runterregulierten Gene aufgelistet. In den **Tabellen 4-3** und **4-5** wurden in der gleichen Reihenfolge zu den jeweiligen Genen die biologischen Prozesse, an denen diese beteiligt sind, die zelluläre Lokalisation und die molekulare Funktion aufgelistet, sofern diese in der Literatur bekannt sind.

Nach Exposition mit 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol kommt es in BV-2-Mikrogliazellen zu einer Phosphorylierung der Kinasen MEK1/2, ERK1/2, JNK/SAPK und p38 und zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB bzw. Elk-1. Weiterhin geht 7-Ketocholesterol in den Zellkern von BV-2 Zellen und aktiviert dort über Schädigung der DNA die PARP-1 (Poly-(ADP-ribose)-polymerase-1). Zusätzlich konnte noch die veränderte Genexpression in BV-2-Zellen nach 7-Ketocholesterol mittels DNA-Mikroarray gezeigt werden.

Erklärung zu den Tabellen 4.2, 4.4, 4.6 und 4.7:

Signal	...	gescanntes Signal nach Justierung und abzüglich des Hintergrundes
Call	...	wenn Signal signifikant höher oder niedriger war als der Chip-Durchschnitt mit P – Present, A – Absent, NC – No Call oder M – Marginal (unmöglich nach A oder P einzuteilen)
Change	...	Veränderung zur Kontrolle mit I – Increased oder D -Decreased
SLR	...	Angabe der Veränderung des Signales zur Kontrolle um log2

Tabelle 4-2: Die ersten 20 hochregulierten Gene nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol (7KC)

Genesymbol	Kontrolle		30min 7KC				2h 7KC				4h 7KC				Titel
	Signal	Call	Signal	Call	SLR	Change	Signal	Call	SLR	Change	Signal	Call	SLR	Change	
Laptm4b	9	P	458	P	5,4	I	501	P	5,2	I	519	P	5,8	I	lysosomal-associated protein transmembrane 4B
Pem	69	P	3291	P	5,1	I	3529	P	5,2	I	3560	P	5,6	I	placentae and embryos oncofetal gene
Cnn3	22	P	313	P	3,8	I	324	P	3,7	I	302	P	3,6	I	calponin 3, acidic
Mcoln3	88	P	950	P	3,5	I	792	P	3,4	I	811	P	3,5	I	mucolipin 3
Gas6	25	P	512	P	3,5	I	444	P	3,5	I	455	P	3,4	I	growth arrest specific 6
S100a6	57	P	499	P	3	I	429	P	3,5	I	550	P	3,3	I	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)
C1qb	69	P	494	P	3,5	I	451	P	3,3	I	441	P	3,3	I	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
Fabp3	19	P	98	P	2,7	I	113	P	2,9	I	110	P	3	I	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
Trf	58	P	798	P	3,1	I	642	P	3,1	I	625	P	3	I	transferrin
Idb1	32	P	218	P	2,8	I	193	P	2,9	I	204	P	3	I	inhibitor of DNA binding 1
Marco	75	P	727	P	3,2	I	680	P	3,1	I	594	P	2,9	I	macrophage receptor with collagenous structure
S100a8	11	P	73	P	1,8	I	75	P	2,9	I	99	P	2,6	I	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
Pilrb1	122	P	679	P	2,4	I	684	P	2,5	I	788	P	2,5	I	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 1
Apoe	650	P	3655	P	2,3	I	3586	P	2,3	I	3768	P	2,3	I	apolipoprotein E
Mfhas1	44	P	214	P	2,1	I	206	P	2,3	I	167	P	2,3	I	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
Mgl2-pending	13	P	56	P	2,6	I	49	P	2,3	I	44	P	2,3	I	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2
Sec61a2-pending	87	P	268	P	1,5	I	271	P	1,6	I	418	P	2,2	I	SEC61, alpha subunit 2 (S. cerevisiae)
Trfr	68	P	145	P	1	I	137	P	1	I	293	P	2,2	I	transferrin receptor
Nbea	6	P	26	P	1,8	I	31	P	1,6	I	35	P	2,2	I	neurobeachin
Mafb	88	P	440	P	2,2	I	435	P	2,1	I	418	P	2,1	I	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)

Tabelle 4-3: Biologische Prozesse, zelluläre Komponente und molekulare Funktion der ersten 20 hochregulierten Gene nach 7-Ketocholesterol-Exposition

Gensymbol	Title	Biologischer Prozess	zelluläre Komponente	molekulare Funktion
Laptn4b	lysosomal-associated protein transmembrane 4B	Zellproliferation und Überleben	Membranintegriert	
Pem	placentae and embryos oncofetal gene	Regulation der Transkription, DNA-abhängig	Zytoplasma, Zellkern	DNA-Bindung, Transkriptionsfaktor-aktivität
Cnn3	calponin 3, acidic	Kontraktion der glatten Muskulatur	Protein des Zytoskelettes und strukturelle Komponente des Zytoskelettes, zelluläre Organisation und Biogenese	Actinbindung, Calmodulinbindung
Mcoln3	mucolipin 3	Kationentransport und Differenzierung der Hör-Haar-Zellen	Zytoplasma, Membranintegriert	Kationenalaktivität, Ionenkanalaktivität
Gas6	growth arrest specific 6	Zelladhäsion, Regulation des Zellwachstums	extrazellulär, extrazellulärer Raum	Kalciumionbindung, strukturelle Moleküleaktivität
S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	Zellzyklus, Zellproliferation, Regulation des Zellzyklus		Kalciumionbindung, Wachstumsfaktoraktivität, Proteinbindungsaktivität, Kalcium abhängige Insulinausschüttung, Progression des Zellzyklus, Zellproliferation
C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	Komplementaktivierung,	Zytoplasma, extrazellulärer Raum	
Fabp3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Transport		Bindung, Fettbindung, Transportaktivität, Fettsäurebindung, spielt eine Rolle im Fettsäuremetabolismus,
Trf	transferrin	Eisenionhomeostase, Eiseniontransport	Extrazelluläre, endozytische Vesikel	Eisenionbindung
Idb1	inhibitor of DNA binding 1	Entwicklung, negative Regulation der Transkription des Pol II Promotors	Zellkern	
Marco	macrophage receptor with collagenous structure	Phosphattransport	Zytoplasma, Membranintegriert	Akzeptoraktivität, Scavengerrezeptoraktivität
S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	Chemotaxis		Kalciumionbindung
Pilrb1	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 1			
ApoE	apolipoprotein E	Fetttransport, Lipoproteinmetabolismus,	extrazellulär, extrazellulärer Raum	Heparinbindung, Lipidbindung
Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1			
Mgl2-pending	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2	Karbohydratbindung, Zuckerbindung		
Sec61a2-pending	SEC61, alpha subunit 2 (S. cerevisiae)	Proteinsekretion, Proteintransport	Endoplasmatisches Retikulum, membranintegriert	Proteintranslokaseaktivität
Trfr	transferrin receptor	Endozytose, Eisenionhomeostase	Endosome, membranintegriert	Eiseniontransportaktivität, Peptidaseaktivität
Nbea	neurobeachin	Proteinlokalisierung	Golgiapparat, Membran	Proteinkinase A Bindung
MafB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)	positive Regulation der Transkription des PolII Promotor, Regulation der Transkription, DNA-abhängig, Respirationsgasaustausch,	nucleus, transcription factor complex	DNA-binding, protein binding

Tabelle 4-4: Die ersten 20 herunterregulierten Gene nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol (7KC)

Kontrolle			30min 7KC				2h 7KC				4h 7KC				Titel
Genesymbol	Signal	Change	signal	Call	SLR	Change	signal	Call	SLR	Change	signal	Call	SLR	Change	
Serpinb1a	796	P	3	A	-7,7	D	1	A	-10	D	1	A	-9,7	D	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1a
Ifi205	232	P	6	A	-4,9	D	2	A	-6,2	D	1	A	-8,5	D	interferon activated gene 205
Col4a5	227	P	5	A	-5,1	D	4	A	-5,6	D	1	A	-8	D	procollagen, type IV, alpha 5
Gja1	55	P	2	A	-5,3	D	4	A	-3,6	D	0	A	-7,9	D	gap junction membrane channel protein alpha 1
Qpct	148	P	2	A	-6,6	D	1	A	-7,6	D	1	A	-6,9	D	glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase)
Car8	110	P	2	A	-5,5	D	0	A	-7,5	D	1	A	-6,9	D	carbonic anhydrase 8
Akr1c13	172	P	5	A	-5,4	D	1	A	-6,4	D	1	A	-6,6	D	aldo-keto reductase family 1, member C13
C1qr1	151	P	2	A	-6,2	D	0	A	-7,2	D	1	A	-6,3	D	complement component 1, q subcomponent, receptor 1
Il7r	92	P	7	A	-3,6	D	8	P	-3,6	D	2	A	-6,3	D	interleukin 7 receptor
Fscn1	59	P	1	A	-5,3	D	1	A	-6,6	D	1	A	-6,2	D	fascin homolog 1, actin bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)
Pla2g5	166	P	5	A	-5,4	D	1	A	-7,1	D	4	A	-6,1	D	phospholipase A2, group V
Cd36	392	P	10	M	-5,2	D	11	P	-5,7	D	9	A	-6	D	CD36 antigen
Ifi204	31	P	0	A	-5,4	D	3	A	-3,5	D	1	A	-5,9	D	interferon activated gene 204
Hao1	83	P	21	A	-1,1	D	4	A	-3,5	D	1	A	-5,8	D	hydroxyacid oxidase 1, liver
Calcr1	33	P	4	A	-3	D	0	A	-5,4	D	0	A	-5,8	D	calcitonin receptor-like
Steap	75	P	12	A	-2,2	D	4	A	-3,8	D	1	A	-5,7	D	six transmembrane epithelial antigen of the prostate
Mras	160	P	18	A	-3,3	D	10	A	-4,3	D	3	A	-5,6	D	muscle and microspikes RAS
D11Lgp2e	93	P	6	A	-3,9	D	3	A	-5,1	D	3	A	-5,6	D	DNA segment, Chr 11, Lothar Hennighausen 2, expressed
Ccl6	374	P	6	A	-5,6	D	4	A	-6	D	5	A	-5,5	D	chemokine (C-C motif) ligand 6
Neo1	186	P	2	A	-4,8	D	3	A	-5,8	D	4	A	-5,4	D	neogenin

Tabelle 4-5: Biologische Prozesse, zelluläre Komponente und molekulare Funktion der ersten 20 herunterregulierten Gene nach 7-Ketocholesterol-Exposition

Genesymbol	Titel	Biologischer Prozess	zelluläre Komponente	Molekulare Funktion
Serpinb1a	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1a	Regulation des Proteinstoffwechsels	Unbekannt	Endopeptidaseinhibitoraktivität, Peptidaseaktivität, Serine-Type Endopeptidaseinhibitoraktivität
Ifi205	interferon activated gene 205			
Col4a5	procollagen, type IV, alpha 5	Zelladhäsion	Membrane, Kollagen, Kollagen Type IV, extrazelluläre Matrix	Strukturkomponente der extrazellulären Matrix
Gja1	gap junction membrane channel protein alpha 1	Zellkommunikation, Zell-Zell-Signaling, Entwicklung embryonaler Herzgefäße, Regulation der Herzrate	Konnexonkomplex, Gap-junction, membranintegriert	Konnexonkanalaktivität, Gap-junctionbildung, kanalaktivität
Qpct	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)		extrazellulärer Raum	Transferaseaktivität
Car8	carbonic anhydrase 8	Ein-Karbon-Komponentenmetabolismus, Phosphoinositol vermittelte Signalgebung	Zytoplasma	Karbonatdehydrataseaktivität, Proteinbindung, Zinkionenbindung
Akr1c13	aldo-keto reductase family 1, member C13	Xenobiotischer Metabolismus		Aldo-keto Reduktaseaktivität, Oxidoreduktaseaktivität
C1qr1	complement component 1, q subcomponent, receptor 1	Zelladhäsion, Abwehrreaktion	Zytoplasmatische Vesikel, extrazellulärer Raum, Plasmamembran, membranintegriert	Kalцийionenbindung, Proteinbindung, Rezeptoraktivität, Zuckerbindung
Il7r	interleukin 7 receptor			
Fscn1	fascin homolog 1, actin bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)			Aktinbindung
Pla2g5	phospholipase A2, group V	Lipidstoffwechsel	extrazellulärer Raum	Kalцийionenbindung, Hydrolaseaktivität, Phospholipase-A2-Aktivität
Cd36	CD36 antigen			
Ifi204	interferon activated gene 204	Antwort auf DNASchädigung, Signaltransduktion durch p53 als Mediator was eine Induktion von Apoptose, Immuneantwort, Regulation der Transkription , DNA-abhängig	Nucleolus, Nucleoplasm, Zellkern	Proteinbindung
Hao1	hydroxyacid oxidase 1, liver	Elektronentransport, oxidative photosynthetische Karbonweg	Peroxisom	(S)-2-hydroxy-acid oxidase Aktivität, Oxidoreduktase Aktivität
Calcr1	calcitonin receptor-like	G-protein gekoppelter Rezeptor Signalweg	Extrazellulärer Raum, membranintegriert	G-Protein gekoppelte Rezeptoraktivität
Steap	six transmembrane epithelial antigen of the prostate		Membranintegriert	
Mras	muscle and microspikes RAS	small GTPase vermittelte Signaltransduktion		GTPbindung
D11Lgp2e	DNA segment, Chr 11, Lothar Hennighausen 2, expressed			
Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6	Chemotaxiy, Immunantwort, Signaltransduktion	extrazellulär, extrazellulärer Raum	Chemokin- und Zytokinaktivität
Neo1	neogenin	Zelladhäsion, Proteinamino-säure-Phosphorylierung	Membranintegriert, Proteinbindung, vaskulärer endothel Wachstumsfaktor, Rezeptoraktivität	

Tabelle 4-6: Alle Gene, die um mindestesten lg2 (SLR) hochreguliert wurden nach 7-KC

Kontrolle		30min 7KC		2h 7KC		4h 7KC									
Gensymbol	Signal	Change	Signal	Call SLR	Change	Signal	Call SLR	Change	Titel						
Inflammation und Immuneantwort															
C1qb	69	P	494	P	4	I	451	P	3	I	441	P	3,3	I	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
S100a8	11	P	73	P	2	I	75	P	3	I	99	P	2,6	I	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
Pilrb1	122	P	679	P	2	I	684	P	3	I	788	P	2,5	I	paired immunogloblin-like type 2 receptor beta 1
C1qb	25	P	146	P	2	I	144	P	2	I	142	P	2,4	I	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
C1qg	32	A	182	P	2	I	178	P	2	I	140	P	2,2	I	complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide
Il1a	42	P	97	P	2	I	114	P	1	I	42	P	1,7	I	interleukin 1 alpha
Tlr1	37	P	93	P	2	I	113	P	2	I	102	P	1,3	I	toll-like receptor 1
Tnfaip2	371	P	827	P	1	I	915	P	2	I	839	P	1,3	I	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
Il1b	84	P	88	P	0	NC	78	P	-0	NC	90	P	-0	NC	interleukin 1 beta
Il10	17	P	19	A	0	NC	17	P	0	NC	28	A	0,3	NC	interleukin 10
Zellstruktur, Adhäsion und Mobilität															
Cnn3	22	P	313	P	4	I	324	P	4	I	302	P	3,6	I	calponin 3, acidic
Col18a1	20	A	86	P	2	I	50	P	2	I	56	P	1,5	I	procollagen, type XVIII, alpha 1
Poteinturnover															
Mrpl19	18	A	93	A	2	I	97	P	3	I	62	A	2,1	M	mitochondrial ribosomal protein L19
Eif2s2	6	P	24	P	2	I	19	P	1	I	17	P	1,4	I	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)
Metabolismus															
Cth	2	A	88	P	6	I	100	P	6	I	86	P	5,3	I	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
Akp2	14	A	428	P	5	I	495	P	5	I	438	P	4,5	I	alkaline phosphatase 2, liver
Neu1	2	A	27	A	4	I	31	M	4	I	16	A	3,6	NC	neuraminidase 1
Elovl4	3	A	45	M	4	I	37	P	4	I	32	P	3,5	I	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 4
Ass1	11	A	172	P	4	I	150	P	4	I	118	P	3,2	I	argininosuccinate synthetase 1
Fabp3	19	P	96	P	3	I	113	P	3	I	110	P	3	I	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
Mgl2-pending	13	P	56	P	3	I	49	P	2	I	44	P	2,3	I	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2
Lpin1	24	P	123	P	2	I	72	P	1	I	87	P	1,9	I	lipin 1
Dpp7	20	P	142	P	2	I	115	P	2	I	108	P	1,8	I	dipeptidylpeptidase 7
Epn2	2	A	13	A	3	I	14	A	2	I	5	A	1,4	I	epsin 2
Dpp7	158	P	332	P	1	I	337	P	1	I	343	P	0,9	I	dipeptidylpeptidase 7
Siat8d	30	A	42	A	0	NC	11	A	-1	NC	24	A	-1	NC	sialyltransferase 8 (alpha-2, 8-sialyltransferase) D
Zellwachstum, Proliferation und Aufrechterhaltung															
Laptn4b	9	P	458	P	5	I	501	P	5	I	519	P	5,8	I	lysosomal-associated protein transmembrane 4B
Mab21l1	1	A	11	A	2	M	3	A	1	NC	22	M	4,1	I	mab-21-like 1 (C. elegans)
Laptn4b	63	P	1352	P	4	I	1651	P	4	I	1135	P	3,9	I	lysosomal-associated protein transmembrane 4B
Gas6	25	P	512	P	4	I	444	P	4	I	455	P	3,4	I	growth arrest specific 6
S100a6	57	P	498	P	3	I	429	P	4	I	550	P	3,3	I	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)
Dda3- pending	58	A	384	P	2	I	356	P	3	I	327	P	2,3	I	differential display and activated by p53
Bmyc	37	A	190	P	3	I	194	P	2	I	133	P	1,9	I	brain expressed myelocytomatosis oncogene
Gnao	10	A	33	P	3	NC	29	P	1	NC	32	P	1,6	I	guanine nucleotide binding protein, alpha o
Rezeptoren und Signaltransduktion															
Mrc1	13	A	720	P	5	I	756	P	6	I	674	P	5,7	I	mannose receptor, C type 1
Rhpn2	0	A	1	A	2	NC	0	A	-0	NC	7	A	4,3	NC	rhophilin, Rho GTPase binding protein 2
Marco	75	P	727	P	3	I	680	P	3	I	594	P	2,9	I	macrophage receptor with collagenous structure
Ptprg	3	A	38	M	2	I	51	P	2	I	67	P	2,5	I	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G
V3R1	2	A	25	P	4	I	4	A	1	NC	9	A	2,2	I	pheromone receptor V3R1
Gprc5b	12	A	43	P	3	I	41	P	3	I	37	A	2	I	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B
Zellzyklus															
Cdkn1c	3	A	59	A	4	I	54	P	4	I	97	M	4,8	I	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)
Mfhas1	44	P	214	P	2	I	206	P	2	I	167	P	2,3	I	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
Sep 03	51	P	203	P	2	I	225	P	2	I	155	P	1,4	I	septin 3

Fortsetzung Tabelle 4-6:

Kontrolle			30min 7KC		2h 7KC		4h 7KC			Titel					
Gene Symbol	Signal	Change	signal	Call SLR	Change	signal	Call SLR	Change							
Transkriptionsfaktoren und DNA-Bindeproteine															
Pem	69	P	3291	P	5	I	3529	P	5	I	3560	P	5,6	I	placentae and embryos oncofetal gene polymerase (DNA directed), eta (RAD 30 related)
Polh	0	A	18	A	6	I	17	P	6	I	6	A	5,4	NC	
Sox4	1	A	85	P	4	I	76	P	5	I	59	P	4,9	I	SRY-box containing gene 4
Mbnl3	1	A	30	P	4	I	32	P	4	I	45	P	4,5	I	muscleblind-like 3 (Drosophila)
Peg10	1	A	21	A	5	I	19	P	5	I	16	A	4,3	NC	paternally expressed 10
Sart3	6	A	12	A	2	NC	20	P	2	I	56	P	4	I	squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3
Sox17	1	A	9	A	4	I	4	A	3	MI	12	A	3,8	MI	SRY-box containing gene 17
Zic3	1	A	5	A	3	I	2	A	2	NC	8	A	3,6	I	zinc finger protein of the cerebellum 3
En2	1	A	11	A	2	NC	18	P	5	NC	18	A	3,3	MI	engrailed 2
Brunol4	3	A	31	A	3	I	28	P	3	I	31	A	3,2	I	bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)
Ddx25	20	A	266	P	3	I	274	P	4	I	199	P	3,1	I	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 25
Ear4	1	A	27	P	4	I	9	A	3	I	18	A	3	NC	eosinophil-associated ribonuclease 4
Brunol4	4	A	17	P	2	I	18	P	3	I	18	P	3	I	bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)
Idb1	32	P	218	P	3	I	193	P	3	I	204	P	3	I	inhibitor of DNA binding 1
Dnmt2	2	A	8	A	2	NC	21	P	4	I	18	A	2,9	I	DNA methyltransferase 2
Atrx	1	A	25	A	4	I	28	P	4	I	13	A	2,8	I	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog (human)
D3Ertd330e / Fubp1	7	A	40	P	4	I	59	P	4	I	23	A	2,3	NC	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 330, expressed
Idb3	68	P	239	P	2	I	289	P	2	I	312	P	2,1	I	inhibitor of DNA binding 3
Mafb	88	P	440	P	2	I	435	P	2	I	418	P	2,1	I	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)
E2f6	173	P	697	P	2	I	979	P	2	I	717	P	1,9	I	E2F transcription factor 6
Zfp146	5	P	32	P	2	I	24	P	2	I	19	P	1,7	I	zinc finger protein 146
Sf3b1	75	P	718	P	3	I	651	P	3	I	231	P	1,5	I	splicing factor 3b, subunit 1
Pparbp	18	A	149	P	2	I	157	P	3	I	57	P	1,3	NC	peroxisome proliferator activated receptor binding protein
Zfp207	56	A	278	P	2	I	229	P	2	I	83	P	0,9	NC	zinc finger protein 207
Sp1	32	P	251	P	3	I	263	P	3	I	55	P	0,7	I	trans-acting transcription factor 1
Pabpc1	3049	P	4362	P	1	MI	3855	P	0	NC	4612	P	0,6	I	poly A binding protein, cytoplasmic 1
Pparbp	14	A	43	A	2	NC	52	A	2	I	19	A	-1	NC	peroxisome proliferator activated receptor binding protein
Apoptose															
Stip	1	A	61	P	6	I	42	P	6	I	44	A	5,9	I	stress induced protein
Gadd45g	11	A	47	P	2	I	71	P	3	I	68	P	2,3	I	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma
Ionenkanäle und Transportproteine															
Atp10a	0	A	21	M	7	I	1	A	0	I	7	A	4,9	I	ATPase, class V, type 10A
Mcoln3	88	P	950	P	4	I	792	P	3	I	811	P	3,5	I	mucolipin 3
Trf	58	P	798	P	3	I	642	P	3	I	625	P	3	I	transferrin
Cox7c	3	A	17	P	3	I	15	P	1	I	21	A	2,7	NC	cytochrome c oxidase, subunit VIIc
Apoe	650	P	3655	P	2	I	3586	P	2	I	3768	P	2,3	I	apolipoprotein E
Ap2a2	4	A	21	A	3	I	27	P	3	NC	13	A	2,3	NC	adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit
Sec61a2-pending	87	P	268	P	2	I	271	P	2	I	418	P	2,2	I	SEC61, alpha subunit 2 (S. cerevisiae)
Trfr	68	P	145	P	1	I	137	P	1	I	293	P	2,2	I	transferrin receptor
Cox7c	9	A	42	P	2	I	32	P	2	I	35	P	1,9	I	cytochrome c oxidase, subunit VIIc
Sorl1	83	P	342	P	2	I	332	P	2	I	279	P	1,7	I	sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing
Atp1a1	338	P	1455	P	2	I	1110	P	2	I	1050	P	1,6	I	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide
Xpo4	44	P	253	P	2	I	214	P	2	I	124	P	1,3	I	exportin 4
Kinasen und Phosphatasen															
Dm15	18	A	80	P	2	I	63	P	2	I	81	P	2,2	I	dystrophia myotonica kinase, B15
Nbea	6	P	26	P	2	I	31	P	2	I	35	P	2,2	I	neurobeachin
Ptpn14	110	P	384	P	2	I	481	P	2	I	554	P	2	I	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14
Ckb	29	A	149	P	2	I	113	P	2	I	131	P	2	I	creatine kinase, brain

Tabelle 4-7: Alle Gene, die um mindestesten lg2 (SLR) herunterreguliert wurden nach 7-KC

Kontrolle														30min 7KC			2h 7KC			4h 7KC			
Gene Symbol	Signal	Change	Signal	Call	SLR	Change	signal	Call	SLR	Change	signal	Call	SLR	Change	Titel								
Inflammation und Immunantwort																							
Ifi205	232	P	6	A	-5	D	2	A	-6	D	1	A	-9	D	interferon activated gene 205								
Il7r	92	P	7	A	-4	D	8	P	-4	D	2	A	-6	D	interleukin 7 receptor								
Ifi204	31	P	0	A	-5	D	3	A	-4	D	1	A	-6	D	interferon activated gene 204								
Ccl6	374	P	6	A	-6	D	4	A	-6	D	5	A	-6	D	chemokine (C-C motif) ligand 6								
Ifi203	115	P	14	A	-3	D	2	A	-6	D	1	A	-5	D	interferon activated gene 203								
Ccl5	897	P	6	A	-6	D	26	A	-4	D	19	A	-5	D	chemokine (C-C motif) ligand 5								
Cxcl10	213	P	5	A	-6	D	13	A	-4	D	8	A	-5	D	chemokine (C-X-C motif) ligand 10								
Fgls-pending	1728	P	99	P	-4	D	80	P	-5	D	100	P	-4	D	fragilis								
Ccl7	681	P	24	A	-4	D	28	P	-4	D	28	P	-4	D	chemokine (C-C motif) ligand 7								
Tnfrsf9	498	P	20	A	-5	D	21	A	-5	D	29	A	-4	D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9								
Ifit3	87	P	5	A	-4	D	15	A	-2	D	5	A	-4	D	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3								
Ian6	34	P	9	A	-2	NC	10	A	-2	D	2	A	-4	D	immune associated nucleotide 6								
Gtpi-pending	35	P	3	A	-4	D	7	A	-3	D	3	A	-4	D	interferon-g induced GTPase								
Il7r	280	P	25	M	-3	D	27	P	-3	D	21	P	-4	D	interleukin 7 receptor								
Cxcl14	26	P	3	A	-2	D	1	A	-4	D	1	A	-3	D	chemokine (C-X-C motif) ligand 14								
Cxcl2	107	P	16	P	-2	D	7	P	-3	D	8	P	-3	D	chemokine (C-X-C motif) ligand 2								
Oasl2	154	P	7	A	-4	D	3	A	-6	D	15	A	-3	D	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2								
Ly6a	346	P	32	A	-3	D	39	A	-3	D	25	A	-3	D	lymphocyte antigen 6 complex, locus A								
Ifi203	79	P	5	A	-3	NC	0	A	-7	D	5	A	-3	D	interferon activated gene 203								
Il6	90	P	13	A	-3	D	5	A	-4	D	10	A	-3	D	interleukin 6								
Ifit2	109	P	4	A	-4	D	3	A	-4	D	9	A	-3	D	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2								
H2-Q7	244	P	34	P	-3	D	25	P	-3	D	30	P	-3	D	histocompatibility 2, Q region locus 7								
Tnfrsf6	49	P	5	A	-3	NC	7	A	-2	D	5	A	-3	D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6								
Ii	1017	P	192	P	-2	D	211	P	-2	D	142	P	-3	D	Ia-associated invariant chain								
Ccl4	1288	P	290	P	-2	D	222	P	-2	D	219	P	-3	D	chemokine (C-C motif) ligand 4								
Ctla2b	74	P	17	P	-2	D	4	A	-4	D	11	A	-3	D	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta								
Il2rg	664	P	136	P	-3	D	156	P	-3	D	154	P	-3	D	interleukin 2 receptor, gamma chain								
Ccl2	2088	P	307	P	-3	D	419	P	-2	D	367	P	-2	D	chemokine (C-C motif) ligand 2								
Il2rg	443	P	42	P	-3	D	89	P	-2	D	73	P	-2	D	interleukin 2 receptor, gamma chain								
Ccl12	62	P	32	A	-1	D	27	A	-1	D	13	A	-2	D	chemokine (C-C motif) ligand 12								
Il1rn	306	P	84	P	-2	D	72	P	-2	D	108	P	-2	D	interleukin 1 receptor antagonist								
Ccl3	3135	P	1017	P	-2	D	955	P	-2	D	761	P	-2	D	chemokine (C-C motif) ligand 3								
H2-T23	625	P	188	P	-2	D	194	P	-1	D	159	P	-2	D	histocompatibility 2, T region locus 23								
Zellstruktur, Adhäsion und Mobilität																							
Col4a5	227	P	5	A	-5	D	4	A	-6	D	1	A	-8	D	procollagen, type IV, alpha 5								
C1qr1	151	P	2	A	-6	D	0	A	-7	D	1	A	-6	D	complement component 1, q subcomponent, receptor 1								
Fscn1	59	P	1	A	-5	D	1	A	-7	D	1	A	-6	D	fascin homolog 1, actin bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)								
Neo1	186	P	2	A	-5	D	3	A	-6	D	4	A	-5	D	neogenin								
Pcdh7	72	P	17	A	-3	D	2	A	-6	D	2	A	-5	D	protocadherin 7								
Tm4sf2	109	P	22	A	-2	D	5	A	-5	D	6	A	-4	D	transmembrane 4 superfamily member 2								
Itga6	24	P	4	A	-3	NC	19	P	-0	NC	2	A	-4	D	integrin alpha 6								
Clecsf9	370	P	36	P	-3	D	29	P	-4	D	24	P	-4	D	C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 9								
F5	75	P	18	A	-1	NC	3	A	-4	D	5	A	-3	D	coagulation factor V								
Vcl	23	P	1	A	-3	NC	4	A	-2	D	2	A	-3	NC	vinculin								
Clstn1	213	P	16	A	-3	D	54	A	-2	D	16	A	-3	D	calsyntenin 1								
Neo1	400	P	45	A	-3	D	29	A	-3	D	26	A	-3	D	neogenin								
Isg15	373	P	38	A	-3	D	18	A	-4	D	45	A	-3	D	interferon-stimulated protein								
Tm4sf2	89	P	10	A	-2	D	8	A	-3	D	10	A	-3	D	transmembrane 4 superfamily member 2								
Arhu	44	P	5	A	-2	D	12	A	-2	D	5	A	-3	D	ras homolog gene family, member U								
Emilin1-pending	30	M	4	A	-2	NC	5	A	-2	D	5	A	-3	D	elastin microfibril interface located protein 1								
Col4a5	174	P	23	P	-3	NC	18	A	-2	MD	21	P	-2	D	procollagen, type IV, alpha 5								
Eng	57	A	15	A	-2	NC	17	A	-2	NC	11	A	-2	NC	endoglin								
Icam2	127	P	28	A	-2	D	30	A	-2	D	17	A	-2	D	intercellular adhesion molecule 2								
Epdm2-pending	89	P	13	A	-2	D	14	A	-3	D	19	P	-2	NC	ependymin 2								

Fortsetzung Tabelle 4-7

Kontrolle			30min 7KC			2h 7KC			4h 7KC			
Gene Symbol	Signal	Change	Signal	Call SLR	Change	signal	Call SLR	Change	signal	Call SLR	Change	Titel
Proteinturnover												
Serpinb1a	796	P	3	A -8	D 1	A -10	D 1	A -10	D	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1a		
Hspb7	107	P	4	A -5	D 2	A -5	D 3	A -5	D	heat shock protein family, member 7 (cardiovascular)		
Serpinb1b	96	P	18	A -2	D 5	A -4	D 3	A -5	D	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1b		
Serpini1	15	P	22	A 0	NC 2	A -3	D 1	A -4	D	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade I, member 1		
Ctsh	230	P	11	A -4	D 20	P -4	D 17	M -4	D	cathepsin H		
Usp18	465	P	51	P -3	D 35	P -4	D 35	P -4	D	ubiquitin specific protease 18		
Cst7	1128	P	151	P -3	D 88	P -3	D 85	P -4	D	cystatin F (leukocystatin)		
Cabc1	38	P	8	A -3	MD 13	A -1	D 4	A -3	NC	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex like (S. pombe)		
Dtx2	226	P	59	A -2	D 85	A -1	D 29	A -3	D	deltex 2 homolog (Drosophila)		
Osp94	206	P	35	A -2	D 14	A -3	D 19	A -3	D	osmotic stress protein		
Hp	136	P	22	A -3	D 34	A -2	D 23	A -3	D	haptoglobin		
Capn5	165	P	19	A -3	D 33	A -2	D 25	A -2	D	calpain 5		
Sec15	28	A	9	A -2	NC 9	A -2	MD 8	A -2	NC	SEC15 homolog (S. cerevisiae)		
Dnajb10	86	P	25	A -2	D 12	A -3	D 15	A -2	NC	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 10		
B3galt6	50	P	24	P -1	D 12	P -2	D 12	P -2	D	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6		
Uchl1	532	P	101	P -2	D 98	P -2	D 100	P -2	D	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1		
Metabolismus												
Car8	110	P	2	A -6	D 0	A -8	D 1	A -7	D	carbonic anhydrase 8		
Akr1c13	172	P	5	A -5	D 1	A -6	D 1	A -7	D	aldo-keto reductase family 1, member C13		
Pla2g5	166	P	5	A -5	D 1	A -7	D 4	A -6	D	phospholipase A2, group V		
Hao1	83	P	21	A -1	D 4	A -4	D 1	A -6	D	hydroxyacid oxidase 1, liver		
Gyg1	465	P	10	A -5	D 14	A -5	D 12	A -5	D	glycogenin 1		
Akr1c12	233	P	13	A -4	D 10	A -4	D 10	A -4	D	aldo-keto reductase family 1, member C12		
Gldc	33	P	5	A -2	MD 5	A -3	D 3	A -4	D	glycine decarboxylase		
Ptgds	48	P	22	A -2	NC 14	M -2	D 5	A -4	NC	prostaglandin D2 synthase (brain)		
Upp	76	P	16	A -2	D 18	A -2	D 3	A -4	D	uridine phosphorylase		
Agrn	85	P	4	A -3	D 2	A -5	D 6	A -3	D	agrin		
Nos2	48	A	5	A -3	D 2	A -5	D 4	A -3	D	nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage		
Cd38	145	P	8	A -4	D 17	A -3	D 17	A -3	D	CD38 antigen		
Siat8d	187	P	19	P -4	D 21	P -3	D 28	P -3	D	sialyltransferase 8 (alpha-2, 8-sialyltransferase) D		
Pcdha1	59	P	11	A -3	D 5	A -3	D 8	A -3	D	protocadherin alpha 1		
Pip5k1a	59	P	2	A -5	D 6	A -3	D 8	A -3	D	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 alpha		
Ptgs2	72	P	23	P -2	D 19	P -2	D 14	A -3	D	prostaglandin-endoperoxide synthase 2		
Sult4a1	63	P	7	A -2	MD 7	A -3	D 8	A -2	D	sulfotransferase family 4A, member 1		
Pip5k1a	128	P	46	A -1	D 23	A -3	D 26	A -2	D	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 alpha		
Hpcl-pending	43	P	4	A -4	NC 6	A -3	D 10	A -2	D	2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase		
Cav2	510	P	82	P -3	D 115	P -2	D 86	P -2	D	caveolin 2		
Alg12-pending	33	P	39	A 0	NC 4	A -3	D 7	A -2	NC	dolichyl-p-mannose:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase (yeast)		
Alas1	83	P	51	A -1	D 33	A -1	D 13	A -2	D	aminolevulinic acid synthase 1		
Ptgs1	172	P	31	P -2	D 37	P -2	D 72	P -2	D	prostaglandin-endoperoxide synthase 1		
Kinasen und Phosphatasen												
Eif2ak1	54	P	5	A -3	D 17	A -2	D 5	A -3	D	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1		
Ppap2a	406	P	86	P -2	D 80	P -2	D 96	P -2	D	phosphatidic acid phosphatase 2a		
Ptprn	103	A	32	A -1	NC 28	A -2	D 23	A -2	NC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N		
Prkn	188	P	48	P -2	D 37	P -2	D 43	P -2	D	protein kinase C, nu		
Pfkip	556	P	115	P -3	D 115	P -2	D 135	P -2	D	phosphofructokinase, platelet		
Mapkapk2	787	P	528	P -1	D 592	P -0	D 539	P -1	D	MAP kinase-activated protein kinase 2		
Apoptose												
Biklk	40	P	29	A -0	NC 3	A -4	D 4	A -3	NC	Bcl2-interacting killer-like		
Bnip3	1908	P	256	P -3	D 214	P -3	D 214	P -3	D	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3		
Bcl2a1a	807	P	86	P -3	D 88	P -3	D 99	P -3	D	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a		
Casp7	2	A	2	A -0	NC 0	A -3	NC 1	A -3	NC	caspase 7		
Hspa1b	14	P	14	A -0	NC 8	A -1	NC 3	A -2	NC	heat shock protein 1B		
Fastk	129	P	46	A -1	D 30	A -1	D 16	A -2	D	Fas-activated serine/threonine kinase		

Fortsetzung Tabelle 4-7

Kontrolle			30min 7KC			2h 7KC			4h 7KC			
Gene Symbol	Signal	Change	Signal	Call SLR	Change	signal	Call SLR	Change	signal	Call SLR	Change	Title
Rezeptoren und Siganltransduktion												
Calcrl	33	P	4	A -3	D	0	A -5	D	0	A -6	D	calcitonin receptor-like
Mras	160	P	18	A -3	D	10	A -4	D	3	A -6	D	muscle and microspikes RAS
Lat	94	P	9	A -3	D	5	A -4	D	8	A -5	NC	linker for activation of T cells
Ptger4	21	P	10	A -0	NC	6	P -1	D	1	A -4	D	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
Fnbp2	31	P	3	A -3	D	1	A -4	D	2	A -4	D	formin binding protein 2
Tgfb2	52	P	4	A -4	D	5	A -3	D	5	A -3	NC	transforming growth factor, beta receptor II
Csprs	28	P	19	A -1	D	2	A -3	D	1	A -3	D	component of Sp100-rs
Sh3bp5	210	P	41	A -2	D	23	A -3	D	16	A -3	D	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)
Prss11	66	P	6	A -4	MD	7	A -3	D	6	A -3	D	protease, serine, 11 (Igf binding)
Ppicap	304	P	47	A -3	D	37	P -3	D	46	P -3	D	peptidylprolyl isomerase C-associated protein
Dner	18	P	3	A -3	D	6	A -2	D	4	A -3	D	delta/notch-like EGF-related receptor
Gfra1	11	A	8	A -0	NC	1	A -4	NC	2	A -2	NC	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1
Rtkn	28	A	14	A -1	NC	8	A -2	D	6	A -2	NC	rhotekin
Mox2r	106	P	13	A -3	D	18	A -3	D	30	A -2	D	antigen identified by monoclonal antibody MRC OX-2 receptor
Ccr5	22	P	11	A -1	NC	7	A -1	D	3	A -2	NC	chemokine (C-C motif) receptor 5
Dnm1l	1	A	6	P 3	I	1	A 0	NC	0	A -2	NC	dynamin 1-like
Sh3bp5	297	P	97	P -2	D	79	P -2	D	67	P -2	D	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)
Pde7a	16	P	20	A 0	NC	2	A -2	D	1	A -2	NC	phosphodiesterase 7A
Tlr3	43	M	11	A -2	D	7	A -2	D	9	A -2	D	toll-like receptor 3
Wnt10a	74	P	18	A -1	NC	22	A -2	D	23	A -2	D	wingless related MMTV integration site 10a
Scarb2	228	P	257	P -0	NC	272	P 0	NC	212	P -0	D	scavenger receptor class B, member 2
Transkriptionsfaktoren und DNA-Bindeproteine												
D11Lgp2e	93	P	6	A -4	D	3	A -5	D	3	A -6	D	DNA segment, Chr 11, Lothar Hennighausen 2, expressed
Rad51c	78	P	7	A -3	D	8	A -3	D	3	A -5	D	Rad51 homolog c (S. cerevisiae)
Aebp1	71	P	39	A -1	NC	8	A -3	D	6	A -4	D	AE binding protein 1
Fsrg3	49	P	5	A -3	D	1	A -4	D	2	A -4	D	female sterile homeotic-related gene 3
Trim30	106	P	9	A -4	D	7	A -4	D	14	A -4	D	tripartite motif protein 30
Nxf7	34	P	2	A -4	NC	6	A -2	D	3	A -4	D	nuclear RNA export factor 7
Rbpms	18	P	2	A -2	NC	2	A -2	MD	0	A -4	MD	RNA binding protein gene with multiple splicing
Cstf2t -pending	125	P	2	A -6	D	2	A -6	D	13	A -3	D	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA subunit 2, tau
Oas1c	47	P	8	A -2	D	8	A -2	D	6	A -3	D	2'-5' oligoadenylate synthetase 1C
Irf7	475	P	31	A -4	D	19	A -4	D	32	A -3	D	interferon regulatory factor 7
Hist1h4h	11	P	2	A -2	NC	7	A -0	NC	2	A -3	D	histone 1, H4h
Etv1	84	P	34	P -2	D	31	P -1	D	12	P -3	D	ets variant gene 1
Hist1h2bc	972	P	155	P -2	D	132	P -3	D	142	P -3	D	histone 1, H2bc
Hist1h2bp	1432	P	253	P -3	D	230	P -3	D	206	P -3	D	histone 1, H2bp
Ssbp2	28	P	14	A -0	NC	11	A -1	D	3	A -3	NC	single-stranded DNA binding protein 2
Sp100	39	P	6	A -3	NC	11	A -1	D	7	A -3	D	nuclear antigen Sp100
Runx2	83	P	9	A -3	D	15	A -2	D	13	A -2	D	runt related transcription factor 2
Pdlim1	250	P	52	A -2	D	27	A -3	D	50	A -2	D	PDZ and LIM domain 1 (elfin)
Batf	265	P	54	A -2	D	40	A -3	D	43	A -2	D	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
Mef2c	123	P	44	M -1	D	35	P -2	D	18	A -2	D	myocyte enhancer factor 2C
Trim30	108	P	38	P -2	D	14	A -2	D	24	A -2	D	tripartite motif protein 30
Pcbp4	109	P	28	P -1	D	22	P -2	D	17	P -2	D	poly(rC) binding protein 4
Pa26 -pending	41	P	29	P -1	D	13	P -2	D	12	P -2	D	p53 regulated PA26 nuclear protein
transferase												
Qpct	148	P	2	A -7	D	1	A -8	D	1	A -7	D	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)
Gys1	82	P	6	A -3	D	23	A -2	D	11	A -3	D	glycogen synthase 1, muscle
Oas3	332	P	61	A -3	D	53	A -3	D	42	A -3	D	2'-5' oligoadenylate synthetase 3
Soat1	37	P	16	A -2	NC	7	A -3	D	6	A -3	NC	sterol O-acyltransferase 1
Oas1l	666	P	90	P -3	D	89	P -3	D	82	P -3	D	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1
Gcnt2	54	P	22	A -2	D	5	A -3	D	8	A -2	D	glucosaminyltransferase, I-branching enzyme
Mmab	34	P	6	A -2	NC	3	A -3	D	4	A -2	D	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) type B homolog (human)

Fortsetzung Tabelle 4-7:

Kontrolle														30min 7KC			2h 7KC			4h 7KC				
Genesymbol	Signal	Change	Signal	Call	SLR	Change	Signal	Call	SLR	Change	Signal	Call	SLR	Change	Title									
Zellwachstum, Proliferation und Aufrechterhaltung																								
Olfm1	163	P	7	A	-4	D	6	A	-4	D	3	A	-4	D	olfactomedin 1									
Nedd9	14	P	7	A	-0	NC	4	A	-2	D	1	A	-3	MD	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9									
Rras2	232	P	34	A	-3	D	26	P	-3	D	24	A	-3	D	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2									
Gas7	56	P	9	A	-3	NC	4	A	-3	D	7	A	-3	D	growth arrest specific 7									
Azi1	37	P	18	A	-1	NC	26	A	-1	MD	4	A	-3	D	5-azacytidine induced gene 1									
Olfm1	32	P	1	A	-4	MD	3	A	-3	D	3	A	-3	D	olfactomedin 1									
Crim1	7	P	1	A	-4	NC	3	A	-3	D	2	A	-3	NC	cysteine-rich motor neuron 1									
Asph	10	A	5	A	-2	NC	4	A	-1	D	3	A	-2	NC	aspartate-beta-hydroxylase									
Nedd9	18	A	3	A	-2	NC	1	A	-3	D	3	A	-3	NC	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9									
Ets1	6	A	6	A	-0	NC	3	A	-1	NC	2	A	-3	NC	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain									
Serpine1	100	P	5	A	-4	D	9	A	-3	D	18	A	-2	D	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 1									
Cdv1	96	P	36	P	-2	D	39	P	-2	D	35	P	-2	D	carnitine deficiency-associated gene expressed in ventricle 1									
Ionenkanäle und Transportproteine																								
Gja1	55	P	2	A	-5	D	4	A	-4	D	0	A	-8	D	gap junction membrane channel protein alpha 1									
Cd36	392	P	10	M	-5	D	11	P	-6	D	9	A	-6	D	CD36 antigen									
Gja1	149	P	2	A	-6	D	5	A	-5	D	4	A	-5	D	gap junction membrane channel protein alpha 1									
Kcnn4	194	P	8	A	-4	D	8	A	-5	D	5	A	-5	D	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4									
Slc16a3	729	P	26	A	-5	D	17	A	-6	D	35	A	-5	D	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3									
Cp	88	P	3	A	-4	D	6	A	-3	D	2	A	-5	D	ceruloplasmin									
Kcnn4	100	P	4	A	-5	D	15	A	-3	D	3	A	-5	D	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4									
Rbp4	734	P	28	P	-5	D	15	P	-5	D	29	M	-4	D	retinol binding protein 4, plasma									
Pcdha11	52	P	2	A	-5	D	1	A	-6	D	3	A	-4	D	protocadherin alpha 11									
Cp	72	P	5	A	-4	D	3	A	-5	D	4	A	-4	D	ceruloplasmin									
Atp9a	69	P	21	A	-2	MD	21	A	-2	D	7	A	-4	D	ATPase, class II, type 9A									
Fabp4	941	P	61	P	-4	D	53	P	-4	D	57	P	-4	D	fatty acid binding protein 4, adipocyte									
Slc1a4	57	P	9	A	-3	D	15	A	-2	D	7	A	-4	D	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4									
Cp	51	P	1	A	-5	D	0	A	-6	D	4	A	-4	D	ceruloplasmin									
Sfxn4	39	P	3	A	-3	D	14	P	-1	D	4	A	-3	D	sideroflexin 4									
Kcnk2	89	P	5	A	-4	D	9	A	-3	D	8	A	-3	D	potassium channel, subfamily K, member 2									
Cyp3a41	6	P	0	A	-4	D	4	A	-1	NC	1	A	-3	NC	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 41									
Aqp8	217	P	44	A	-2	D	36	P	-2	D	29	A	-3	D	aquaporin 8									
Msr1	35	P	11	A	-1	NC	45	P	0	NC	7	A	-2	NC	macrophage scavenger receptor 1									
Anxa6	194	P	37	A	-3	D	40	A	-3	D	43	A	-2	D	annexin A6									
Slc13a3	20	P	16	A	-1	D	4	A	-3	D	9	A	-2	D	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3									
Cacna1a	9	M	25	A	0	NC	18	A	1	NC	2	A	-2	NC	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit									
Anxa6	409	P	139	P	-2	D	124	P	-2	D	113	P	-2	D	annexin A6									
Fxyd2	35	P	6	A	-3	NC	4	A	-4	D	9	A	-2	D	FXD domain-containing ion transport regulator 2									
Stxbp1	254	P	66	P	-2	D	47	P	-2	D	55	P	-2	D	syntaxin binding protein 1									
Cp	161	P	7	A	-3	D	1	A	-6	D	21	A	-2	D	ceruloplasmin									
Ero1l	1066	P	235	P	-2	D	264	P	-2	D	271	P	-2	D	ERO1-like (S. cerevisiae)									
D11Ert18e	40	P	13	A	-1	NC	14	A	-1	D	12	A	-2	D	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 18, expressed									
Zellzyklus																								
Gas7	147	P	17	A	-3	D	20	A	-3	D	11	A	-3	D	growth arrest specific 7									
Cdkn2a	117	P	22	A	-2	D	9	A	-4	D	16	A	-3	D	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A									
Sdccag8	15	P	7	A	-2	D	7	A	-2	D	5	A	-2	D	serologically defined colon cancer antigen 8									
Ccng2	85	P	46	P	-1	NC	27	P	-2	D	17	P	-2	D	cyclin G2									

5 Diskussion

Multiple Sklerose ist gekennzeichnet durch die Zerstörung von Myelin und eine deutliche Veränderung sowohl des Cholesterols aus dem Myelin als auch des Fettstoffwechsels im ZNS. Der Cholesterolspiegel wird in diesem Zusammenhang als biologischer Marker für die Krankheit diskutiert (Giubilei et al. 2002). Die Bedeutung des Cholesterolgeleichgewichtes im Zusammenhang mit der Pathologie von Multipler Sklerose - und nicht zuletzt mit dem Voranschreiten der einzelnen klinischen Subtypen - wird durch ein gesteigertes Level von hirnspezifischen und peripheren Sterolen in diesen Fällen verstärkt (Teunissen et al. 2003). Die Identifizierung von Cholesterool oxidationsprodukten in tierischem und menschlichem Serum und Gewebe wird aber auch mit vielen anderen Krankheiten in Verbindung gebracht (Sevanian et al. 1994). Das derzeitige Verständnis der Funktion von Oxysterolen im ZNS *in vivo* ist jedoch begrenzt. Ein großer Teil der heute bekannten Fakten stammt aus Untersuchungen am *in vitro* Modell, insbesondere an dem der Zellkultur. Diese Untersuchungen umfassen Kulturen von Zellen neuronalen oder glialen Ursprungs, wie primäre, embryonische und postnatale Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen (Chang and Phelan 2002).

Es gibt zwei Untergruppen von Gliazellen: zum einen die der Makroglia, zu welchen Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymalzellen gehören, zum anderen die der Mikroglia, welche 10-20 % aller Gliazellen ausmachen (Benveniste 1997). Mikrogliazellen wurden zum ersten Mal von Del Rio-Hortega (1932) beschrieben. Sie gehören zur Familie der Monozyten und Makrophagen und sind im Gehirn ansässige Gewebemakrophagen. Allgemein wird angenommen, dass Mikroglia mesodermalen Ursprungs sind und aus Rückenmarks-Precursor-Zellen entstehen. Diese bilden sich während der frühen embryonalen Entwicklung und unterwandern das ZNS. Weiterhin geht der derzeitige Forschungsstand davon aus, dass es sich bei den Mikroglia um eine Zellpopulation handelt, die sich von peripheren Blutmakrophagen separiert hat (Ling & Wong 1993, Lawson et al. 1991).

Mikroglia befinden sich prinzipiell im ZNS und ihre Funktion ist ähnlich der von Makrophagen. So schließt ihr Funktionsspektrum Phagozytose, Antigenpräsentation, die Produktion von Zytokinen und Eicosanoiden, Komplement-Komponenten, excitatorische Aminosäuren (Glutamat), Proteinasen, oxidative Radikale und NO mit ein (Banati et al. 1993, Gordon 1995, Gehrman et al. 1995). Als Reaktion auf eine neuronale Degeneration werden Mikrogliazellen unter strikter Kontrolle in potentielle zytotoxische Zellen transformiert. Ein charakteristisches Merkmal von Mikroglia ist ihre schnelle Aktivierung als Antwort auf auch nur geringe pathologische Veränderungen im ZNS. Sie gelten als Hauptfaktor bei der Abwehr von Infektionen, Entzündungen, Traumata, Hirntumoren

und Neurodegenerationen, indem sie einwandernde Mikroorganismen zerstören, Zelltrümmer entfernen, die Regeneration von Gewebe fördern und so das Gleichgewicht im Gewebe wiederherstellen (Kreuzberg 1996).

5.1 Einfluss von 7-Ketocholesterol im Gehirngewebe

Cholesterol ist ein essentieller Bestandteil in der Plasmamembran von nichtneuronalen und neuronalen Komponenten, wie z. B. Gliazellen und Neuronen. Es ist aber auch in den speziellen Membranen des Myelin vorzufinden, dessen Abbauprodukte leicht in den intrazellulären Raum diffundieren können (Bjorkhem and Meaney 2004, Posse de Chaves et al. 2000). Durch eine von freien Radikalen vermittelte Peroxidation des Cholesterols kommt es direkt zur Entstehung von Oxysterolen (Miyajima et al. 2001). Eines dieser Oxidationsprodukte ist 7-Ketocholesterol, das durch Autooxidation von Cholesterol entsteht (Schroepfer 2000).

Bei Patienten mit Multipler Sklerose konnte ein erhöhter Gehalt an oxidierten Cholesterolen (Oxysterolen) im Liquor mittels Gaschromatographie / Massenspektroskopie nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen lediglich eine sehr geringe oder kaum detektierbare Konzentration von Oxysterolen gemessen. Das am häufigsten auftretende Oxysterol war 7-Ketocholesterol mit 7,37 mg/L (+/- 0,32 mg/L). In einem Vergleich der Konzentrationen im Liquor und im Serum zeigte sich, dass dieses 7-Ketocholesterol auch wirklich aus dem ZNS stammt (Diestel et al. 2003). Auch Leoni et al. (2004) konnten feststellen, dass der Oxysterolgehalt im Liquor von Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten, die neuronale Schädigung oder Demyelinisierung bewirken, stärker beeinflusst wird als im Plasma. Analysen mittels HPLC brachten eine 7-Ketocholesterolkonzentration von 8,5 mg/L (+/- 0,29 mg/L) bei Multiple-Sklerose-Patienten hervor. Zwar konnte auch bei Patienten mit anderen neuroinflammatorischen Krankheiten eine erhöhte 7-Ketocholesterolkonzentration festgestellt werden, jedoch lag diese immer noch deutlich unter der von MS-Patienten (Diestel et al. 2003). Auf Grund der gefundenen 7-Ketocholesterolkonzentrationen wurden alle nachfolgenden Untersuchungen dementsprechend mit einer Konzentration von 10 mg/L durchgeführt.

Ong et al. (2002) konnten zeigen, dass 7-Ketocholesterol eine neuronale Schädigung in hippokampalen Schnittkulturen hervorrufen kann. Untersuchungen der Funktion von Mikroglia und einwandernden Makrophagen in einem virus-induzierten Modell für ZNS-Demyelinisierung zeigte, dass Mikrogliazellen in diesem Fall eine durchaus bedeutende Rolle spielen. Sie sind beteiligt an der Präsentation von Antigenen und der Zerstörung des Myelins (Mack et al. 2003).

5.1.1 Akkumulation und Abbau von 7-Ketocholesterol durch nichtneuronale Komponenten

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von hippokampalen Schnittkulturen gezeigt werden, dass 7-Ketocholesterol fast ausschließlich von nichtneuronalen Komponenten akkumuliert und nachfolgend abgebaut wird. Wurden OHSKs mit BV-2 Mikrogliazellen und 7-Ketocholesterol behandelt, kam es innerhalb weniger Stunden zu einer starken Akkumulation dieses Oxysterols, insbesondere dann, wenn die Mikrogliazellen mittels LPS voraktiviert wurden (s. Abb. 4-1). Während der nächsten drei Tage erfolgte ein deutlicher Abbau des 7-Ketocholesteroles, wobei die höchste Abbaurate schon nach 24 Stunden erreicht wurde. Es ist möglich, dass die einwandernden Mikrogliazellen sowohl eine zusätzliche Freisetzung des 7-Ketocholesterol bewirken als auch den Entgiftungsmechanismus der Zellen stören können. Handelt es sich um schon voraktivierte Mikrogliazellen, wird dieser Effekt um ein Vielfaches verstärkt. Es kommt aber nicht nur zu einer starken Akkumulation des 7-Ketocholesteroles, sondern es erfolgt auch ein viel schnellerer Abbau des Selbigen. In den Kontrollen war deutlich zu erkennen, dass OHSKs, die nicht von Mikrogliazellen unterwandert waren, das exogene 7-Ketocholesterol weder akkumulieren noch abbauen konnten. Da die Schnitte ohne Mikrogliazellen nicht in der Lage waren, 7-Ketocholesterol abzubauen, lag die Vermutung nahe, dass die neuronalen Komponenten nicht in der Lage waren 7-Ketocholesterol zu verwerten. Er war somit nötig, noch genauer zu untersuchen, inwieweit neuronale und nichtneuronale Zellen an der Wirkung von 7-Ketocholesterol beteiligt sind.

Die intensive Stimulation mit NMDA bewirkt einen Anstieg im intrazellulären Calciumgehalt. Calcium induziert die Produktion von freien Radikalen, insbesondere von Superoxid (Rudolph et al. 2000, Sengpiel et al. 1998). NMDA löst somit einen oxidativen Stress aus, welcher eine Schlüsselrolle während des neuronalen Zelltodes spielt. Innerhalb kürzester Zeit nach der NMDA-Behandlung kommt es zu einem Anstieg der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und einem sich anschließenden neuronalen Zellsterben. Indem in hippokampalen Schnittkulturen zunächst alle neuronalen Komponenten mittels NMDA-Behandlung eliminiert wurden (s. Abb. 4-8), konnte bewiesen werden, dass die Degradierung und Akkumulierung nur durch nichtneuronale Komponenten erfolgt. Es wurde lediglich ein minimaler Unterschied in der Verwertung von 7-Ketocholesterol zwischen mit BV-2-Zellen unterwanderten OHSKs, bei denen zuvor die neuronalen Komponenten eliminiert wurden, und mit BV-2-Zellen unterwanderten OHSKs, mit intakten neuronalen Komponenten, gemessen. Weiterhin war festzustellen, dass HT22 im Vergleich zu BV-2-Mikrogliazellen 7-Ketocholesterol nicht abbauen können (s. Abb. 4-6). HT22 waren nicht in der Lage 7-Ketocholesterol abzubauen, während besonders voraktivierte BV-2-Mikrogliazellen den Vorgang des Abbaus von 7-Ketocholesterol sehr schnell bewirkten.

5.1.2 Rolle neuronaler Komponenten bei der Freisetzung von 7-Ketocholesterol

In geringen Maßen sind auch Neuronen an der Freisetzung von 7-Ketocholesterol nach oxidativem Stress beteiligt. In den Untersuchungen an den OHSKs konnte nach 4 Stunden ein geringer Unterschied in der freigesetzten 7-Ketocholesterolmenge, zwischen den Schnitten mit noch lebenden Neuronen ($220 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Protein}}$) und den Schnitten, in denen im Voraus die Neuronen mit $50 \mu\text{M}$ NMDA eliminiert wurden ($185 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Protein}}$) (s. Abb. 4-8), beobachtet werden. Demnach war die gemessene Konzentration an 7-Ketocholesterol in OHSKs mit lebenden Neuronen höher. Diese Differenz entsprach in etwa der Menge 7-Ketocholesterol, die von mit $50 \mu\text{M}$ NMDA geschädigten primären Neuronen ($40 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Protein}}$) freigesetzt wurde (s. Abb. 4-9). Ein direkter Effekt von NMDA auf Mikrogliazellen wird ausgeschlossen, da die Expression eines NMDA-Rezeptors auf diesen nicht nachgewiesen werden konnte (Heppner et al. 1998). Auch die hippokampalen Neuronen HT22 setzten nach Exposition mit 20 mM Glutamat in geringen Maßen 7-Ketocholesterol frei (s. Abb. 4-10). Dabei zeigten die Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden nur einen Vitalitätsverlust von weniger als 10 %. Möglicherweise sind die freigesetzten Mengen an 7-Ketocholesterol dennoch dem Cholesterol der Plasmamembran der abgetöteten Neuronen zuzuschreiben.

Neurodegenerative Krankheiten sind eng verbunden mit exzitotoxischen Hirnschäden, welche eine Freisetzung von großen Mengen an Glutamat, Aspartat und anderen ähnlichen exzitatorischen Aminosäuren in den extrazellulären Raum im ZNS bewirken. All diese sind mögliche Liganden für den endogenen NMDA-Rezeptor (Heppner et al. 1998). Glutamat ist ein Modulator der T-Lymphozyten-Funktion und Glutamat-Exzitotoxizität. Dieser Fakt wird als ein Mechanismus bei Demyelinisierung diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten von Multiple-Sklerose-Patienten abnormal auf Glutamat reagieren (Lombardi et al. 2003). Chang et al. (1998) beschreiben aber auch eine toxische Wirkung von Oxysterolen, wie 7-Ketocholesterol oder 25-Hydroxycholesterol, auf sympathische Neuronen aus Ratten. In diesen Untersuchungen wies 25-Hydroxycholesterol bei $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ eine sehr starke Toxizität auf. 7-Ketocholesterol dagegen zeigte bei gleicher Konzentration lediglich einen sehr geringen Effekt. (Chang et al. 1998) Trotz der Freisetzung von 7-Ketocholesterol durch neuronale Komponenten lässt sich festhalten, dass dieser Effekt relativ gering gehalten ist und der Hauptanteil des freigesetzten 7-Ketocholesteroles auf die nichtneuronale Komponenten wie Mikroglia zurückzuführen ist. Wie bereits erwähnt, konnte 25-Hydroxycholesterol zwar im Liquor von Multiple-Sklerose-Patienten mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie nachgewiesen werden, war jedoch mit der schnelleren und einfacheren HPLC-Methode nicht nachweisbar und wurde aus diesem Grund bei diesen Untersuchungen nicht mit in Betracht gezogen.

5.1.3 7-Ketocholesterol-bedingte Wechselwirkung zwischen neuronalen und nichtneuronalen Zellen

Es konnte in der Monokultur weder bei aktivierten noch bei nicht aktivierten Mikrogliazellen eine Akkumulation des Oxysterols 7-Ketocholesterol beobachtet werden, sondern es erfolgte ein sofortiger Abbau innerhalb weniger Stunden nach Zugabe des 7-Ketocholesterol. Dies kann als Hinweis auf eine mögliche intensive Wechselwirkung zwischen Mikroglia und den Neuronen angesehen werden. In der letzten Dekade gab es viele Untersuchungen zu den funktionellen Wechselwirkungen zwischen Axonen und Gliazellen während der Entwicklung und Regeneration nach Verletzungen. Dabei kristallisierte sich nach und nach der Umfang und die Komplexität von Glia-Neuronen und Glia-Glia-Kommunikation heraus (Ayers et al. 2004).

Da es im Slice Versuch zunächst zu einer Akkumulation von 7-Ketocholesterol kam und erst im Nachhinein zum Abbau durch Mikroglia, wie die Untersuchungen mit BV-2 Zellen zeigten, muss eine Interaktion zwischen neuronalen und nichtneuronalen Komponenten bestehen. Diese starke Akkumulation könnte auf den gestörten Entgiftungsmechanismus der Zellen zurückzuführen sein. Sie könnte aber auch eine Verstärkung des Aktivierungsgrades der Zellen und somit möglicherweise eine weitere Freisetzung von 7-Ketocholesterol bewirken, sowohl durch die aktivierten Mikroglia als auch durch mikroglial geschädigte Neuronen. In jedem Fall wurde hier die zweigeteilte Rolle von Mikrogliazellen nach Exposition mit 7-Ketocholesterol, in einer Konzentration, wie sie bei MS-Patienten gefunden wurde, klar herausgestellt. Mikrogliazellen sind in der Lage, 7-Ketocholesterol sowohl aufzunehmen als auch abzubauen.

Da die Akkumulation von 7-Ketocholesterol nur im OHSK nachgewiesen werden konnte, ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere nichtneuronale Komponenten an der 7-Ketocholesterol Freisetzung und Akkumulation beteiligt sind. Es ist bekannt, dass sowohl Gliazellen als auch Neuronen aus dem ZNS Enzyme enthalten, welche Cholesteroxide in verschiedene Metabolite umwandeln können (Zang et al. 1997). Besonders Astrozyten sind in die Bildung der Blut-Hirn-Schranke involviert und deshalb der erste Gliatyp, der mit der Inflammation konfrontiert wird. Man weiß aber auch, dass Mikroglia vermutlich sehr früh auf Entzündungsreaktionen, noch bevor sie die Myelinschäden beseitigen, reagieren. Zwischen den Gliazellen besteht eine Interaktion, die über Zytokinen und Chemokine vermittelt wird (Kerschensteiner et al. 2003).

Weiterhin konnte durch Zellfärbung mittels Propidiumjodid veranschaulicht werden, dass neuronale Schädigung durch 7-Ketocholesterol hauptsächlich durch Mikrogliazellen bewirkt wird. In diesen Untersuchungen wurden OHSKs nach der Behandlung mit 7-Ketocholesterol - in der Konzentration wie sie im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose vorgefunden wurde - nach der

Einwanderung von BV-2-Mikrogliazellen bzw. nach Behandlung mit 7-Ketocholesterol und BV-2-Mikrogliazellen mit Propidium-Jodid angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht (s. Abb. 4-2). Nach 3 Tagen zeigte sich bei Behandlung mit 7-Ketocholesterol nur eine leicht erhöhte Zelltodrate innerhalb der neuronalen Schichten des Hippokampus. Wurden auf die Slices Mikrogliazellen in Gegenwart von 7-Ketocholesterol gegeben, kam es innerhalb der neuronalen Schichten zu einer deutlichen Erhöhung der Zelltodrate. Durch Anfärbung der Neurofilamente wurde klar erkennbar, dass es sich hierbei tatsächlich nur um tote Neuronen handelt (s. Abb. 4-3).

Mikrogliazellen bewirken eine zusätzliche Freisetzung von 7-Ketocholesterol (s. Abb. 4-1) in OHSKs. Aber Mikrogliazellen allein bewirken keine signifikante Schädigung in den Slices, wie die Propidium-Jodid-Färbung zeigen konnte. Man kann also ausschließen, dass die neuronale Schädigung direkt durch 7-Ketocholesterol hervorgerufen wird, sondern, dass Mikrogliazellen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der neuronalen Toxizität von 7-Ketocholesterol haben. Dieses Oxysterol löst anscheinend einen inflammatorischen Signalweg in Mikrogliazellen aus, der dann wiederum das Zellsterben bewirkt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Mikrogliazellen, da sie in der Lage sind 7-Ketocholesterol abzubauen, den Metabolismus zur Detoxifikation von 7-Ketocholesterol fördern (s. Abb. 4-1 und Abb. 4-6). Man kann ihnen also in diesem Falle eine zweigeteilte Rolle, die sich sowohl um den Schutz als auch um die Schädigung der Neuronen dreht, zuordnen.

Amoeboide Mikroglia sind nicht klar trennbar von Makrophagen aus dem Blut und unter bestimmten Bedingungen, welche eine Beeinträchtigung der Bluthirnschranke voraussetzen, könnten diese in das ZNS einwandern und dort ebenfalls geschädigtes Hirngewebe phagozytieren (Smith 2001). Li et al. (1996) konnten jedoch zeigen, dass Mikroglia die dominierende phagozytierende Population in frühen Stadien der Demyelinisierung sind, während Makrophagen erst in den späteren Stadien eine Rolle spielen. Man kann aber dennoch davon ausgehen, dass auch anderen Zellen an dem Schädigungs-Schutz-Mechanismus beteiligt sind.

5.1.4 Aufnahme von 7-Ketocholesterol in den Zellkern

Die Aufnahme von 7-Ketocholesterol in das Zellinnere von Mikrogliazellen ist nicht nur auf das Zytosol beschränkt. Untersuchungen des Zellkernes ergaben, dass LPS-voraktivierte BV-2-Mikrogliazellen, die mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol - der ungefähren Konzentration die im Liquor von MS-Patienten gefunden wurde – behandelt wurden, dieses dort ebenfalls akkumulieren. Innerhalb einer Stunde stieg die Konzentration von 7-Ketocholesterol auf 2,25 mg/L an. Es muss demnach zum einen Transportmechanismus für Oxysterole bzw. 7-Ketocholesterol in den Zellkern und zum anderen einen Abbaumechanismus für 7-Ketocholesterol, wie im Zytosol, geben. Ein

gewisser Anteil an der Abnahme von 7-Ketocholesterol im Zellkern ist vermutlich auf das Konzentrationsgleichgewicht zwischen Zellkern und Zytosol zurückzuführen. Dieses kann man jedoch vernachlässigen, da die nukleäre 7-Ketocholesterolkonzentration relativ lange konstant bleibt, während sich die Konzentration von 7-Ketocholesterol der gesamten Zelle schon wieder verringert. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass bei nicht voraktivierten BV-2 Mikrogliazellen die internukleäre 7-Ketocholesterolkonzentration weiter zunimmt, während die der gesamten Zelle abnimmt.

Goldstein und Brown (1990) berichteten, dass Oxysterole im Zellkern die Transkription von Genen der Sterolbiosynthese, einschließlich der HMG-CoA-Reduktase hemmen und dass sie ebenso die Transkription von LDL-Rezeptorgenen unterdrücken können. Eine Keto- oder Hydroxylgruppe an Position 6, 7 oder 25 fördert diese inhibitorische Aktivität. In humanen Fibroblasten kann 7-Ketocholesterol diese Enzyme innerhalb von 2 Stunden um 90 % inhibieren (Brown & Goldstein 1974). Diese Wirkung kann die Biosynthese und Aufnahme von Cholesterol blockieren und die Aufnahme von unveresterten Cholesterol innerhalb der Zelle verhindern (Ridgway et al. 1992).

Epoxy-, Keto- und Hydroxyderivate von Cholesterol können die Neusynthese von Cholesterol, DNA-Synthese, Plasmamembranstruktur, und somit den Transport, Proliferation, und andere Zellfunktionen beeinflussen (Brown et al. 1996). Große Mengen von Cholesterol unterliegen einem Turnover in Gliazellen und Neuronen im ZNS während des Wachstums des Gehirns, der Neuronenreparatur und –wiederherstellung (Dietschy and Turley 2001).

5.1.5 Oxidative Wirkung von 7-Ketocholesterol

Bei den Untersuchungen an hippokampalen Schnittkulturen konnte, während gleichzeitiger Inkubation mit 7-Ketocholesterol und DMPO (5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-oxide), eine deutlich reduzierte Freisetzung von diesem Oxysterol nachgewiesen werden. DMPO ist ein selektiver freier Radikalfänger (Dugan et al. 1995). Gab man zu den OHSKs, die mit aktivierten bzw. nicht aktivierten BV-2-Mikrogliazellen unterwandert waren, neben dem 7-Ketocholesterol zusätzlich den Radikalfänger DMPO, so zeigte sich insbesondere bei den voraktivierten Zellen ein komplettes Verschwinden der 7-Ketocholesterolfreisetzung (s. Abb. 4-5). Dies verdeutlicht den Zusammenhang zwischen 7-Ketocholesterol und der Wirkung von Sauerstoffradikalen, welche durch den oxidativen Angriff von Mikrogliazellen vermittelt wird. Es ist hinreichend bekannt, dass Cholesterol in Gegenwart von Sauerstoff unter bestimmten Bedingungen autooxidiert werden kann. Schon frühzeitig konnte 7-Ketocholesterol als eines der Hauptprodukte dafür identifiziert werden (Chicoye et al. 1968). Während neuronaler Inflammation wandern aktivierte Mikrogliazellen in den Bereich

der neuronalen Schädigung, phagozytieren die benachbarten Zellen und produzieren große Mengen von freien Sauerstoffradikalen, die zur Zellschädigung und zum Zelltod führen können. (Ullrich et al. 2001)

5.2 7-Ketocholesterol im ZNS von Multiple-Sklerose-Patienten und EAE-Mäusen

Multiple Sklerose ist eine Autoimmunkrankheit, die sich auf die weiße Substanz im Zentralen Nervensystem auswirkt. Der Grund hierfür ist zur Zeit noch unbekannt. Man nimmt an, dass Umweltfaktoren eine Immunantwort gegen Myelin-Antigene, aber auch genetische Veranlagung die Krankheit auslösen (Lock & Heller 2003). Das Immunsystem bewirkt dabei eine durch Oligodendrozyten, Axonen und möglicherweise auch Neuronen vermittelte Schädigung des Myelin im ZNS (Noseworthy 2002). Die primäre Demyelinisierung (Entmarkung), die bei Multipler Sklerose beobachtet wird, entsteht durch die Schädigung der Myelinscheiden bzw. der Oligodendrozyten. Makrophagen und Mikroglia sind dabei aktiv am Abbau und der Phagozytose des Myelin beteiligt. (Benveniste 1995) Erhöhte Level von hirnspezifischen und peripheren Sterolen weisen auf eine Rolle des Cholesterolgeleichgewichtes bei Multipler Sklerose hin (Teunissen et al. 2003). Bei Patienten mit Multipler Sklerose konnte man tendenziell ein hohes Level von 24-Hydroxycholesterol während einer aktiven Phase nachweisen (Leoni et al. 2004). Teunissen et al. (2003) schlugen 24S-Hydroxycholesterol sogar als möglichen Marker für Neurodegeneration und Demyelinisierung bei Multipler Sklerose vor.

Einen definierten Labortest für Multiple Sklerose gibt es jedoch noch nicht. Lediglich bei der Erfüllung bestimmter Kriterien kann diese Diagnose gestellt werden. Erstens müssen zwei oder mehrere klinische Beeinträchtigungen zu unterschiedlichen Zeiten aufgetreten sein, zweitens müssen mehrere Läsionen an verschiedenen Stellen in der weißen Substanz detektiert werden können und drittens müssen alle anderen Gründe für diese klinischen Symptome ausgeschlossen werden können (Scolding 2001). Die anfänglichen immer wiederkehrenden klinischen Symptome sind die Konsequenz von reversiblen, inflammatorischen Ereignissen. Dagegen ist der fortschreitende Behinderungsgrad der Patienten auf die steigende axonale Schädigung und neuronalen Zelltod zurückzuführen (Carson 2002). Unregelmäßigkeiten in der Rückenmarksflüssigkeit werden oft genutzt, um die Diagnose zu unterstützen, reichen dafür aber allein nicht aus (Scolding 2001).

5.2.1 7-Ketocholesterol in Gehirnen von Multiple-Sklerose-Patienten

Wie bereits erwähnt, wurde erst kürzlich festgestellt, dass 7-Ketocholesterol erhöht in der Rückenmarksflüssigkeit (Liquor) von Multiple-Sklerose-Patienten und Patienten mit neuroinflammatorischen Krankheiten auftritt und dass dieser Effekt nur den Liquor betrifft und nicht im Serum zu beobachten ist. (Diestel et al. 2003) Weiterhin wurde gezeigt, dass 7-Ketocholesterol eine durch Mikroglia vermittelte neuronale Schädigung hervorrufen kann, aber auch durch die Mikrogliazellen metabolisiert wird.

Es stellte sich nun die Frage, ob 7-Ketocholesterol auch im Gehirn von Multiple-Sklerose-Patienten aufzufinden ist und ob es Unterschiede zwischen dem akuten und chronischen Krankheitsbild gibt. Aus diesem Grunde wurden postmortem Gehirne von Patienten mit akuter und chronischer Multipler Sklerose sowie Patienten ohne jegliche Erkrankung des ZNS mittels HPLC analysiert. Im Vergleich zu den Patienten mit chronischer Multipler Sklerose bzw. Patienten mit keinerlei ZNS-Erkrankungen wurde in den Gehirnen von Patienten mit akuter Multipler Sklerose eine um das 2,6fache höhere 7-Ketocholesterolkonzentration gefunden. Das Gewebe aus dem ZNS der Patienten wurde nach Raine (1997) definiert. In dem Hirngewebe von Patienten mit akuter MS konnte man gliotische Läsionen beobachten. Am Rand dieser Läsionen ist es nachweislich kürzlich zu inflammatorischer Aktivität gekommen. In den Gehirnen dieser Patienten wurden ebenfalls einige neu entstandene akute MS-Läsionen mit Ödemen, aktiv demyelinisierenden Rändern, die reich an inflammatorischen Zellen sind, und zahlreichen hypertrophen Astrozyten detektiert. In Gehirnen von Patienten mit chronischer MS zeigten sich intensiv gliotische und demyelinisierte Läsionen, jedoch mit geringer inflammatorischen Aktivität (Raine 1997). Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der Liquoruntersuchungen und unterstützen die Annahme, dass 7-Ketocholesterol bei Multipler Sklerose eine wichtige Rolle spielt.

5.2.2 Untersuchungen des ZNS von EAE-Mäusen

Trotz der Tatsache, dass das Gehirngewebe sofort nach der Entnahme tiefgefroren und in PBS mit 0,01 % BHT aufgenommen wurde, besteht die Möglichkeit, dass das Cholesterol des präparierten Gewebes einer Autolyse und Autooxidation unterliegen könnte und so das Ergebnis verfälschen würde. Aus diesem Grund wurde die 7-Ketocholesterolproduktion zusätzlich im EAE-Maus-Modell untersucht. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), auch als experimentelle allergische Enzephalomyelitis bezeichnet, ist eine inflammatorische demyelinisierende Erkrankung des ZNS, welche bei Tieren (vorwiegend Nagern) induziert werden kann. Dies geschieht durch Auslösen einer Immunantwort gegen Myelin Epitope (Rao and Segal 2004). Bei der allergischen

Enzephalomyelitis wird die Krankheit durch Mediatoren wie Histamin oder Serotonin induziert. Wird die EAE jedoch mit „Eigenpeptiden“ induziert, spricht man von autoimmuner Enzephalomyelitis (Pedotti et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche SJL-Mäuse mit dem Myelinpeptid PLP (Proteolipid Protein) 139-151 immunisiert. T-Zellen, die spezifisch für PLP 139-151 sind und normalerweise in der Peripherie zirkulieren, werden aktiviert, klonal amplifiziert und produzieren proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , IL-2, TNF- α . Innerhalb von 10 Tagen entwickelt sich die EAE in Form von immer wiederkehrenden Schüben. Das entspricht der RRMS beim Menschen (Begolka et al. 1998, Pedotti et al. 2003).

Das Modell der EAE ermöglichte einen Vergleich des Disease-Score der Krankheit, neuronaler Pathologie und der Akkumulation von 7-Ketocholesterol während der Entwicklung der EAE und dem Rückgang der Krankheit. Nach Induktion der EAE kam es parallel zu einem Anstieg der neuronalen Schädigung im motorischen Bereich des Hirnstammes und zu einem Anstieg der 7-Ketocholesterol-Konzentration (s. Abb. 4-13). Die größten Effekte konnten auf dem Höhepunkt der Krankheit am Tag 12 verzeichnet werden, was gekennzeichnet ist durch den höchsten Disease-Score und deutliche motorische Defizite. Nachfolgend kam es zu einem Rückgang der motorischen Schädigung und der 7-Ketocholesterolkonzentration während der Erholungsphase. Erhöhte 7-Ketocholesterol-Konzentrationen konnten vorwiegend in den von der EAE betroffenen Gehirnregion gemessen werden. Dies betraf vor allem den motorischen Bereich des Hirnstammes. Hier wurden Konzentrationen von 4,14 ng/mg Frischmasse bestimmt. Im Vergleich dazu wurde im nicht betroffenen Kortex eine 7-Ketocholesterolkonzentration von 1,48 ng/mg Frischmasse gemessen. In Tieren, bei denen es nicht zu einer kompletten Erholung von der Krankheit kam, blieb die 7-Ketocholesterolkonzentration weiterhin erhöht. Diese Tatsache weist darauf hin, dass es sich hier um einen selbsterhaltenden Mechanismus chronischer Inflammation handeln muss.

7-Ketocholesterol kann also auch eine wesentliche Rolle bei der EAE zugeordnet werden. In diesem Fall kommt es wie bei der MS besonders während der akuten Phase zu erhöhten Konzentrationen des Oxysterols 7-Ketocholesterol. Wahrscheinlich ist, dass es beim Abbau des Myelins während der Oligodendrozytenschädigung aus der Membran der Zellen freigesetzt wird bzw. aus anderen Cholesterolvorstufen entsteht.

5.3 Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Oxysterole

5.3.1 Einfluss von 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol auf Zytokine und Chemokine

Bei Erkrankungen des Nervensystems spielt die Expression von Zytokinen, besonders innerhalb von Läsionen, eine wichtige Rolle während der Vermittlung der Immunantwort. So entstehen bei Multipler Sklerose im ZNS Läsionen, die in einem engen Zusammenhang mit perivaskulärer Entzündung stehen (Raine 1994). Auch Studien von Elementen des ZNS am Tiermodell der EAE und verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Modellen zeigten, dass Zytokine sowohl an der Induktion als auch an der Regulation der EAE beteiligt sind (Brosnan et al. 1995). In Multiple-Sklerose-Läsionen konnte ein breites Spektrum von Zytokinen, wie die Interleukine (IL) 1, 2, 3, 4, 6, 19 und 12, TNF- α , Lymphotoxin (LT), Interferone (IFN) α , β und γ , TGF β (Transforming growth factor), aber auch Chemokine bestimmt werden (Benveniste 1995). Sie werden innerhalb von Multiple-Sklerose-Läsionen von inflammatorischen Zellen und ZNS-Gliazellen exprimiert. Eine gesteigerte Expression von Zytokinen geht einher mit einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und der Auslösung eines Effektormechanismus. Es gilt jedoch zu beachten, dass diese verschiedenen Zytokine nicht eindeutig nur mit MS-Läsionen assoziiert sind, sondern auch bei anderen neurologischen Erkrankungen exprimiert werden (Cannella & Raine 1995).

Innerhalb des ZNS sind Mikroglia die Gewebe-Makrophagen, welche nachweislich das Potential haben, Zellen, die in das ZNS einwandern, zu regulieren und von diesen reguliert zu werden. Zu diesen Zellen zählt man Immunzellen, wie Lymphozyten, Makrophagen und BZellen, und Zellen des ZNS, wie Neuronen und Gliazellen (Carson 2002). Mikroglia können durch ein breites Spektrum von Zytokinen (IL-1, IL-3, IL-6, TNF- α , LT, MIP 1 α und TGF- β) aktiviert werden. Viele dieser Zytokine, wie zum Beispiel IL-1, IL-6 oder TNF- α , haben proinflammatorische Eigenschaften und vermitteln Entzündungsreaktionen und Demyelinisierung im ZNS (Benveniste 1995). Reaktive Mikroglia können Zytokine jedoch auch selbst sekretieren. Die von ihnen freigesetzten Zytokine umfassen TNF- α , IL-1 α und IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 und IL-10 (Cross & Woodroffe 2001). Die von Mikroglia sekretierten Zytokine TNF- α und IL-1 β können zum Beispiel die synaptische Umwandlung beeinflussen und die Neurodegeneration fördern (Hansson & Rönnebeck 2003). Aber auch Chemokine, wie MCP-1 (Monocyte chemotactic protein 1), MIP-1 α und MIP-1 β (Macrophage inflammatory protein) und das Interferon induzierbare Chemokin IP-10, können von Mikroglia exprimiert werden (Cross & Woodroffe 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 und das Chemokin MCP-1 hinsichtlich der Reaktion von

Mikrogliazellen auf Oxysterole genauer untersucht.

5.3.1.1 *TNF- α*

TNF- α ist, wie schon erwähnt, an Demyelinisierungsprozessen im ZNS beteiligt. Durch Produktion von sekretierten und membrangebundenen TNF- α sind aktivierte Mikroglia hier involviert. TNF- α ist in der Lage, Oligodendrozyten zu schädigen, wobei bei diesem Prozess das membrangebundene TNF- α viel effektiver ist. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einem direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Mikroglia und Oligodendrozyten kommen muss (Benveniste 1995, Cross & Woodroffe 2001). Nach Exposition von BV-2-Mikroglia mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol über 48 Stunden, konnte eine deutlich erhöhte TNF- α -Produktion um das Doppelte bis Dreifache der Ausgangskonzentration für beide Oxysterole gemessen werden (s. Abb. 4-15). 25-Hydroxycholesterol gilt im Allgemeinen toxischer als 7-Ketocholesterol und hatte bei allen Untersuchungen eine stärkere Wirkung als dieses. Es wurde hier mit in die Untersuchungen einbezogen, da es neben 7-Ketocholesterol im Liquor von MS-Patienten gemessen wurde (unveröffentlichte Daten). Man kann also sagen, dass Mikrogliazellen durch diese beiden Oxysterole eine Signalkette auslösen, welche zur Produktion von TNF- α führt.

In akuten MS-Läsionen ist die Immunoreaktivität von TNF- α innerhalb des ZNS in hohen Mengen im Zentrum der Läsionen in Makrophagen und in geringeren Mengen in den Mikroglia am Rand der Läsionen zu finden. Das höchste Level von TNF- α konnte in chronischen Läsionen beobachtet werden (Brosnan 1995). Die Beteiligung von TNF- α an demyelinisierenden Krankheiten wurde vielfach dokumentiert. So erreichte die Expression dieses Proteins während der EAE ihren Höhepunkt auf dem stärksten Ausprägungsgrad der Krankheit. Als Quelle für TNF- α werden auch hier Makrophagen und Mikroglia beschrieben (Benveniste 1997). Jedoch muss beachtet werden, dass TNF- α auch bei anderen neurologischen Erkrankungen in Makrophagen und Mikroglia erhöht auftritt (Brosnan 1995) und somit die TNF- α -Expression nicht pauschalisiert werden darf und immer im Zusammenhang mit anderen Zytokinen betrachtet werden muss.

Weiterhin wird beschrieben, dass in Gegenwart von IFN- γ und TNF- α die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, CD40, B7.2 und B7.1 dramatisch hochreguliert wird (Aloisi 2001, Nguyen & Benveniste). Dies geht einher mit den Ergebnissen von Diestel et al. (2003), anhand derer bewiesen wurde, dass sich in Mikrogliazellen nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol hier die Expression der Integrine bzw. Adhäsionsmoleküle CD11a und ICAM-1 erhöht. Man kann also annehmen, dass 7-Ketocholesterol unter anderem über TNF- α die Expression von CD11a und ICAM-1 reguliert.

5.3.1.2 *IL-1*

Bei vielen neuropathologischen Vorgängen spielt IL-1 eine bedeutende Rolle (Allan & Rothwell 2001). IL-1 steht in enger Verbindung mit Prozessen, die zum neuronalen Zelltod führen. Aktivierte Gliazellen, hauptsächlich Mikroglia und ins ZNS einwandernde Immunzellen, sind die Hauptquelle für IL-1 nach Infektionen, Exzitotoxizität oder mechanischer Schädigung (Hanisch 2002). Das Zytokin IL-1 β kann neben Mikroglia auch von anderen Zellen des ZNS, wie Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen, produziert werden. Es hat, genau wie TNF- α , eine proinflammatorische Wirkung (Barone & Feuerstein 1999) und wird häufig in Zusammenhang mit diesem diskutiert. In Multiple Sklerose Läsionen wird IL-1 hauptsächlich von Makrophagen innerhalb der Läsionszentren, von Mikroglia am Läsionsrand, und auch außerhalb der Läsionen exprimiert. In akuten Läsionen tritt dieses Interleukin in hohen Konzentrationen auf und bleibt auf diesem Level auch noch in den chronisch aktiven Läsionen. In chronisch nicht aktiven Läsionen aber verringert sich die Konzentration vergleichsweise. Aber auch dieses Zytokin wird bei anderen neurologischen Erkrankung in gemäßigteren Konzentrationen exprimiert (Cannella & Raine 1995).

In der Zellkultur ist IL-1 auf der Oberfläche von Mikroglia ein Aktivierungssignal, welches die zusätzliche Produktion von inflammatorischen Zytokinen und reaktiven Stickstoffspezien in Astrozyten induziert (Brosnan et al. 1995). Nach Exposition von BV-2-Mikroglia mit 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol kam es jedoch in den hier diskutierten Untersuchungen zu keiner IL-1 β Ausschüttung. Die Konzentrationen lagen außerhalb des messbaren Bereiches. Man kann also davon ausgehen, dass 7-Ketocholesterol an einem Signalweg, der zu einer gesteigerten IL-1 β Expression führt, nicht beteiligt ist.

5.3.1.3 *IL-6*

Das Zytokin IL-6 wird von Mikroglia besonders in der frühen Phase von ZNS-Schädigungen ausgeschüttet. Dieses Interleukin kann sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken. Ebenso kann es einen Einfluss auf Astrozyten, wodurch diese dann in die Geweberegenerierung mit einbezogen werden (Raivich et al. 1999). Zusammen mit dem M-CSF stuft man IL-6 als einen der Hauptmediatoren für mikrogliale Aktivierung ein (Streit et al. 2000). IL-6 hat ein breites Spektrum von Aktivitäten, von Differenzierung bis hin zur Immunantwort. Während der Multiple Sklerose gilt IL-6 als potentieller Auslöser der Immunreaktion in der akuten Phase und bewirkt einen schnellen und umfassenden Mechanismus, welcher der Schädigung entgegenwirkt (Brosnan et al. 1995). IL-6 wird von der Mehrheit der perivaskulären, inflammatorischen Zellen in akuten Multiple-Sklerose-Läsionen exprimiert. In Läsionen, die charakterisiert sind durch Inflammation und Demyelinisierung, zeigten in situ Hybridisierungen, dass IL-6 zusammen mit TNF- α das

verbreitetste und am intensivsten exprimierte Zytokin ist (Woodrooffe & Cuzner 1993). In den eigenen Untersuchungen an BV-2-Mikrogliazellen konnte nach Exposition mit 7-Ketocholesterol in Konzentrationen, wie sie auch bei Multiple-Sklerose-Patienten gefunden wurden, jedoch keine eindeutig gesteigerte IL-6-Ausschüttung durch Mikroglia gemessen werden. Dieses Oxysterol ist also, wenn es in dieser Konzentration vorliegt, nicht unbedingt an der IL-6 Produktion beteiligt. Nach Behandlung mit 25-Hydroxycholesterol konnte im Gegensatz dazu eine eindeutige IL-6-Ausschüttung gemessen werden, was aber auf die höhere Toxizität des Oxysterols zurückgeführt werden kann. In jedem Fall muss aber 25-Hydroxycholesterol Signalwege anregen, welche dann zur Ausschüttung von IL-6 führen.

5.3.1.4 *IL-10*

Die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 sowie TGF- β teilen die Eigenschaft der antiinflammatorischen, immunsuppressiven und neuroprotektiven Wirkung. Sie können eine Herunterregulierung der mikroglialen Zytokinproduktion von IL-1 und TNF- α bewirken (Hanisch 2002). IL-10 kann zusammen mit TGF- β die Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia inhibieren. Dies geschieht, indem es die Expression von Molekülen, die im Zusammenhang mit der Antigenpräsentation und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Stickstoff- und Sauerstoffradikalen stehen, herunterreguliert (Aloisi 2001). 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol bewirken in BV-2 Mikrogliazellen eine Abnahme von IL-10 um etwa 25 bzw. 30 %. Dies steht im Einklang mit der gemessenen Hochregulierung von TNF- α . Brosnan et al. (1995) zeigten, dass in allen Multiple-Sklerose-Läsionen die Immunoreaktivität für IL-10 fast ausschließlich astroglial war. In chronisch aktiven Läsionen wurde IL-10 hauptsächlich in den Astrozyten der Läsionszentren gefunden und teilweise am Rand der Läsionen. Die Immunoreaktivität für IL-10 wurde jedoch auch in den nicht inflammatorischen Kontrollen gefunden. Man geht daher davon aus, dass IL-10 neben seiner Rolle bei der Regulation von Inflammationen auch einen Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke hat (Brosnan et al. 1995, Cannella & Raine 1995).

5.3.1.5 *MCP-1*

Mikroglia können auch mittels Chemokinen auf Neuronen und Astroglia wirken (Nau & Bruck 2002). So sind Chemokine, wie MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 und RANTES, an der Rekrutierung von Makrophagen in das ZNS beteiligt (Benevise 1997). Bei Untersuchungen von BV-2-Mikrogliazellen hatte 7-Ketocholesterol, in Konzentrationen, wie sie bei Multiple-Sklerose-Patienten gefunden wurden, auf das Chemokin MCP-1 keinerlei Einfluss. Im Gegensatz dazu bewirkte

25-Hydroxycholesterol eine Abnahme der MCP-1-Konzentration. Es gibt Untersuchungen, bei denen im Liquor von Multiple-Sklerose-Patienten während inflammatorischer Demyelinisierung ein gesteigertes Level der Chemokine IP-10, Mig (Monokine induced by INF- γ) und RANTES beobachtet werden konnte, während MCP-1 im Zusammenhang mit der Th2-Antwort abnahm (Huang et al. 2000). Demgegenüber stehen Versuche an der EAE-Maus, in denen MCP-1 neben IP-10 und GRO- α von Astrogliazellen im ZNS exprimiert wird. Die selektive Produktion von MCP-1 in EAE-Läsionen korreliert in diesem Fall mit der Akkumulation von Monozyten und impliziert für MCP-1 ebenfalls eine Rolle während der Schädigungen des ZNS (Ransohoff & Tani 1998). Während der EAE in SJL/J-Mäusen sind Astrozyten die einzigen Zellen, welche im ZNS mRNA-Transkripte von MCP-1 aufweisen (Beneviste 1997). Nau & Bruck (2002) beschreiben, dass Mikrogliazellen in der Lage sind, MCP-1 als Antwort auf experimentelle Stimulation mit IL-1 oder TNF- α zu produzieren.

5.3.2 Auswirkung von Oxysterolen auf das freie Radikal Stickstoffoxid und die induzierbare NO-Synthetase

Stickstoffoxid (NO) ist ein essentieller Neurotransmitter im Gehirn, welcher sowohl den Blutfluss und den Metabolismus im Gehirn als auch die Ausschüttung von Neurotransmittern und die Genexpression regulieren kann. NO kann neuroprotektiv wirken und spielt eine Schlüsselrolle bei der Morphogenese und der synaptischen Plastizität (Calabrese et al. 2000). Jedoch kann die Überproduktion von NO eine zelluläre Schädigung hervorrufen. Zum einen geschieht dies auf direktem Weg, zum Beispiel durch Verschlechterung der Mitochondrienfunktion, und zum anderen werden stärker zytotoxisch reaktive Stickstoffspezien wie Peroxynitrit gebildet (Halliwell 2002). Man spricht dann im Allgemeinen von oxidativem Stress, welcher nicht primär Voraussetzung für den Zelltod ist, jedoch zur Apoptose führen kann. So konnte eine NO-abhängige Apoptose schon in verschiedenen experimentellen Modellen beobachtet werden (Koutsilieri et al. 2002).

5.3.2.1 Bedeutung von NO für Multiple Sklerose

Klinische Studien und Studien am Tiermodell weisen darauf hin, dass NO und sein äußerst reaktives Derivat Peroxynitrit in die Pathogenese der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose involviert sind (Calabrese et al. 2000). So konnte *in vivo* der Nachweis für die Rolle von NO während der Pathogenese des Rückenmarks bei Multiple Sklerose und dem entsprechenden Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis erbracht werden (Giovannoni et al. 1998, Liu et al. 2000, Parkinson et al. 1997, Xu et al. 2001). Stickstoffoxid kann während der Multiplen Sklerose sowohl nützlich als auch schädlich wirken (Parkinson et al. 1997). So wird es als möglicher Faktor angesehen, welcher reversibel die Leitung in demyelinisierten Axonen blockiert

(Giovannoni et al. 1998). Es gibt mehrere *in vitro* Studien, mit denen zudem gezeigt wurde, dass das freie Radikal Stickstoffoxid (NO) zytotoxisch auf Oligodendrozyten und Neuronen, durch Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette und bestimmter Schlüsselenzyme, wirkt (Calebrese et al. 2000, Scott et al. 2003).

Mikroglia, die Immunzellen des ZNS, tragen zu chronischen Neurodegenerationen und oxidativem Stress bei (Koutsilieri et al. 2002). Im aktivierten Zustand produzieren sie neben pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen auch NO und Superoxidradikale (Cross & Woodroffe 2001). Die Bildung von NO durch solche aktivierten Mikroglia kann zu Neurotoxizität führen (Xie et al. 2004). Auch Astrozyten sind in der Lage, NO zu produzieren, jedoch konnte zum Beispiel nach einer LPS-Stimulation gezeigt werden, dass Mikroglia hier mit einer stärkeren NO-Produktion reagieren (Liu et al. 2002).

5.3.2.2 NO-Produktion durch Oxysterole

NO und reaktiven Sauerstoffspezien, wie Superoxidanion (O_2^-), werden eine starke neurotoxische Wirkung zugewiesen (Hemmer et al. 2001). Auch in der Rückenmarksflüssigkeit, im Serum und im Urin von Multiple-Sklerose-Patienten wurden NO und Peroxynitrit ($ONOO^-$) gefunden (Giovannoni et al. 1998). In ersten Vorarbeiten von Diestel et al. (2003) konnte nach Exposition von BV-2-Mikrogliazellen mit einer Konzentration von 7-Ketocholesterol, wie sie auch im Liquor von Multiple-Sklerose-Patienten gefunden worden war (10 mg/L), die höchste Aktivität der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) beobachtet werden. NO spielt bei durch Mikroglia induzierter Neurodegeneration eine entscheidende Rolle (Hemmer et al. 2001).

Aus diesem Grund wurde nun versucht, ein Zeitfenster für die iNOS-Aktivität und für die NO-Ausschüttung nach Inkubation von BV-2-Mikrogliazellen mit jeweils 10 mg/L 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol aufzustellen. Die Exposition von BV-2 Mikrogliazellen mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol bewirkte über einen Zeitraum von 48 Stunden keinen messbaren Anstieg der NO-Ausschüttung, während bei 25-Hydroxycholesterol nach 24 Stunden eine deutlich NO-Ausschüttung gemessen werden konnte (s. Abb. 4-16).

NO kann sehr schnell mit Superoxid zu Peroxynitrit reagieren (Scott et al. 2003). Es ist also nicht auszuschließen, dass 7-Ketocholesterol eine NO-Produktion bewirkt. Es bleibt zu vermuten, dass die Mengen an NO, die produziert wurden, sofort mit Superoxid weiter reagieren. Meistens geht man mittlerweile davon aus, dass die zytotoxischen Wirkungen, welche bisher dem NO zugeschrieben wurden, auf Peroxynitrit zurückzuführen sind (Scott et al. 2003). Im Gegensatz dazu bewirkt 25-Hydroxycholesterol, auf Grund seiner stärkeren Toxizität, eine stärkere Freisetzung von

NO. Dadurch erwies sich die gemessene Zunahme von NO auch als signifikant.

5.3.2.3 *iNOS-Aktivierung in BV-2-Mikrogliazellen*

Sekundäre Schäden, zum Beispiel des Rückenmark, bewirken, dass der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B proinflammatorische Gene wie die iNOS aktiviert. Diese katalysiert die Synthese von NO (Xu et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte in jedem Fall für 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol über 6 Stunden eine ansteigende iNOS-Aktivität gemessen werden (s. Abb. 4-17). 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol bewirkten schon nach 1 Stunde bzw. 30 Minuten eine deutliche Erhöhung der iNOS-Expression in BV-2-Mikrogliazellen. Dieser Effekt konnte während der Behandlung mit Cholesterol allein, welches als Kontrolle in der gleichen Konzentration (10 mg/L) zugegeben wurde, nicht beobachtet werden. Cholesterol bewirkte keine NO-Ausschüttung und es konnte über den Zeitraum von 6 Stunden auch keine Aktivierung der iNOS-Expression beobachtet werden (s. Abb. 4-16 und Abb. 4-17). Das heißt, auf Grund der gesteigerten iNOS-Expression nach Exposition mit 7-Ketocholesterol sollte man annehmen, dass es auch hier zu einer erhöhten NO-Ausschüttung kommt. Das dennoch kein erhöhtes NO-Level nach 7-Ketocholesterolbehandlung gemessen wurde, kann wie vorangegangen schon gezeigt daran liegen, dass das NO sofort weiterreagiert. Um dies zu bestätigen, müsste zusätzlich die Produktion von Peroxynitrit gemessen werden.

5.3.3 Vitalitätsverlust in Mikrogliazellen durch Oxysterole

Vorgänge, die zum neuronalen Zelltod führen, verbinden oxidativen Stress mit mitochondrialer Fehlfunktion und Glutamat-Exzitotoxizität, begleitet von einer gesteigerten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Koutsilieri et al. 2002). Im Zusammenhang mit den NO-Untersuchungen wurde gleichzeitig die Funktion der Mitochondrien über die Reduktion von MTT zu Formazan betrachtet. Dieser Test wird als Indikator für die Zellvitalität verwendet, wobei nur die lebenden Zellen erfasst werden. Hier konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass 25-Hydroxycholesterol bei gleicher eingesetzter Konzentration (10 mg/L) eine höhere Toxizität auf BV-2-Mikrogliazellen aufweist als 7-Ketocholesterol. Nach 48-stündiger Inkubation mit 25-Hydroxycholesterol konnte bei den Zellen nur eine Restvitalität von 40 % beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich der Vitalitätstest für 7-Ketocholesterol als nicht signifikant. Eine Kontrolle mit Cholesterol in gleicher Konzentration wies ebenfalls keinen Vitalitätsverlust auf.

5.4 Oxysterolinduzierte Signalwege

5.4.1 Aktivierung des ERK1/2-, p38- und SAPK/JNK-Signalweges durch Oxysterole

In die Kaskade mitogenaktivierter Proteinkinasen (MAP) sind die durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase (ERK), die stressaktivierte Proteinkinase SAPK bzw. c-Jun NH(2)-terminale Proteinkinase (JNK) und p38 involviert. Während der ERK-Signalweg (auch p42/44) als Antwort auf Wachstumsfaktoren oder oxidativen Stress aktiviert wird, kommt es im Gegensatz dazu zu einer Aktivierung der Kinasen JNK und p38 als Antwort auf inflammatorische Zytokine und Glutamattoxizität (Rincón et al. 2000, Shin et al. 2003). Die Phosphorylierung der Kinasen JNK und p38 kann zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen, welche am Prozess des neuronalen Zelltodes beteiligt sind (Xia et al. 1995). Oxidativer Stress oder Zellproliferation sind Vorgänge, wie sie im Zusammenhang mit der Aktivierung dieser MAP-Kinasen auftreten. Sie wurden auch bei demyelinisierenden Krankheiten, einschließlich der Multiplen Sklerose, beobachtet (Raine 1984, Shin et al. 2003). Auch während der EAE gibt es vielfältige Signalwege, wie auch die der MAP-Kinasen, welche in Neuronen, Gliazellen und inflammatorischen Zellen auftreten. Es ist jedoch nur wenig bekannt über die Aktivierung von MAP-Kinasen im Rückenmark während autoimmuner Inflammation (Shin et al. 2003).

In Arbeiten von Chan et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass es in Makrophagen, welche mit TNF- α und IFN- γ stimuliert wurden, zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK, JNK/SAPK und p38 kommt. Jedoch lediglich die Aktivierung der Familie der JNK/SAPK ist notwendig für die Aktivierung der iNOS und somit der NO-Produktion. Dieser Signalweg reguliert die Phosphorylierung von kB und somit auch nachfolgend die Aktivierung von NF- κB (Calebrese et al. 2000, Chan et al. 1999). Auf der anderen Seite kann NO aber auch die stressaktivierte JNK-Kinase durch S-Nitrosylierung inhibieren (Park et al. 2000).

5.4.1.1 Schnelle Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2

Nach Exposition mit 7-Ketocholesterol in einer Konzentration von 10 mg/L, wie sie auch im Liquor von Multiple-Sklerose-Patienten gefunden wurde, konnte ein deutlicher Effekt auf die MAP-Kinasen MEK1/2, ERK1/2, p38 und SAPK/JNK in BV-2-Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Die Inkubation mit 25-Hydroxycholesterol in gleicher Konzentration ergab einen ähnlichen Effekt, der zum Teil noch stärker war und zusätzlich zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (Ser 133) führte.

Innerhalb der ersten 15 bis 30 Minuten kam es, nach Behandlung mit 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol, zu einer Aktivierung der Kinasen MEK1/2 und ERK1/2, die nach einer Stunde am höchsten war und danach über einen Zeitraum von 15 Stunden wieder abnahm. Es zeigten sich auch Unterschiede nach der Exposition mit 7-Ketocholesterol zwischen MEK1 und MEK2, sowie zwischen ERK1 und ERK2. So erlangte MEK1 eine stärkere und auch frühere Phosphorylierung, nach 5 bis 10 Minuten, als MEK2, bei welcher erst nach 30 Minuten eine beginnende Phosphorylierung erfolgte. Auch ERK1 wurde zeitiger, mit einem Beginn um 5 bis 10 Minuten, und stärker phosphoryliert. Die Phosphorylierung von ERK2 war nur schwach zu erkennen, woraus man schließen kann, dass 10 mg/L 7-Ketocholesterol auf die MAP-Kinasen MEK1 und ERK1 eine intensivere Wirkung hat und somit in den Reaktionsmechanismus nach einer 7-Ketocholesterolexposition stärker involviert sind. Nach Behandlung mit 25-Hydroxycholesterol konnten keine Unterschiede zwischen MEK1 und MEK2 und zwischen ERK1 und ERK2 ausgemacht werden.

In Arbeiten von Combs et al. (1999) wurde gezeigt, dass der MEK-ERK-Signalweg von Bedeutung ist für die Vermittlung des neurotoxischen Effektes durch Mikroglia nach Stimulation mit β -Amyloid. Durch Blockierung der iNOS-Synthetase mittels Parthenoliden, einem Naturprodukt der Sesquiterpenlactone, bewirkt man eine Inhibierung des ERK1/2-Signalweges (Fiebich et al. 2002). Der ERK1/2-Signalweg wird häufig innerhalb der ersten Stunden bzw. Minuten aktiviert. So wurde in verschiedenen Studien zur cerebralen Ischämie nachgewiesen, dass der Beginn der Aktivierung in einem Zeitraum von 5 Minuten bis 2 Stunden liegen kann (Hu et al. 2000, Irving 2001, Namura et al. 2001, Wu et al. 2000).

Die MAP-Kinase ERK1/2 wird durch oxidativen Stress induziert, wobei die Kinase MEK1/2 (MAPK/ERK) zwischengeschaltet sein kann. Diese MAP-Kinase aktiviert ERK1/2 durch Phosphorylierung der Threonine- und Tyrosinreste (Sato et al. 2000). Shin et al. (2003) demonstrierten an Untersuchungen des Rückenmarks von EAE-Ratten, dass ERK1/2 auf dem Höhepunkt der EAE (13. Tag) die stärkste Phosphorylierung erlangt und diese mit dem Rückgang der Krankheit wieder abnimmt. Jedoch war das Level von p-ERK im Vergleich zu Astrozyten in Makrophagen und T-Zellen niedriger (Shin et al. 2003).

5.4.1.2 Der p38-Signalweg

Auch hinsichtlich der Wirkung auf p38 unterschieden sich 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol. Während es nach der Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol zu einem ähnlichen Verlauf wie bei MEK1/2 und ERK1/2 kam, wirkte sich 25-Hydroxycholesterol mit einer stetigen Phosphorylierung von p38 über 15 Stunden aus. p38 zeigte nach der

7-Ketocholesterolbehandlung bereits nach 10 bis 15 Minuten eine deutliche Phosphorylierung.

Da die MAP-Kinasen MEK1 und ERK1 noch früher als p38 phosphoryliert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass diese, in der durch 7-Ketocholesterol ausgelösten Signalkaskade, vor p38 stehen. Bei einer LPS-Aktivierung von Mikrogliazellen steht die Produktion von NO und TNF- α im Zusammenhang mit einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK und p38. So bleibt nach Inhibierung von ERK oder p38 die Produktion von NO und TNF- α aus (Bhat et al. 1998, Pocock & Liddle 2001). Das verdeutlicht, dass beide Kinasen an der Expression von NO und TNF- α beteiligt sind. Weiterhin fand man, dass es nach LPS-Aktivierung von BV-2-Mikrogliazellen nicht nur zu einer Aktivierung von p38 kommt, welche nach 15 bis 20 Minuten ihr Maximum erreicht, sondern auch zu einer Aktivierung der JNK, allerdings nicht über ERK1/2 (Hou et al. 2003). Dies steht im Gegensatz dazu, wie von Fiebich et al. (2002) beschrieben, dass die iNOS-Aktivierung über den ERK1/2-Signalweg vermittelt werden kann.

Xie et al. (2004) konnten nachweisen, dass bei Co-Kultivierung von BV-2-Mikroglia mit primären Mausneuronen die Kinasen p38, JNK und ERK nach Stimulation mit LPS und INF- γ aktiviert werden und es so zu einem Neuronensterben kommt. Eine Inhibierung des ERK-Signalweges bewirkte keinerlei Verhinderung des neuronalen Zelltodes und auch eine JNK-Inhibierung wirkte nur teilweise neuroprotektiv. Lediglich die Inhibierung von p38 zeigte eine reduzierte NO-Produktion in den aktivierten Mikrogliazellen (Xie et al. 2004). Auch in anderen Arbeiten wurde bewiesen, dass die Inhibierung der p38-MAP-Kinase eine reduzierte Inflammation bewirken kann, die mikrogliale Aktivierung herunterreguliert und so neuroprotektiv wirkt (Sugino et al. 2000, Wang et al. 2002). p38 hat also ebenfalls eine entscheidende Bedeutung für die Produktion von NO.

Zusätzlich ist bekannt, dass diese MAP-Kinase die NF- κ B abhängige Genexpression regulieren. Dies geschieht über die für die NF- κ B geförderte Transkription notwendige Regulierung der Phosphorylierung und nachfolgenden Aktivierung des TATA-Bindungsprotein (TBP) (Carter et al. 1999). Die meisten Zytokine haben in der Promotorsequenz eine NF- κ B Bindungsstelle, wodurch p38 eine Bedeutung für die Zytokingenexpression erlangt. Der MEK-ERK-Signalweg reguliert ebenfalls die NF- κ B-getriebene Genexpression und ist wichtig für die Induktion der Zytokinexpression nach LPS-Stimulation von Makrophagen. Ist dieser Signalweg konstitutiv aktiv, wird hier die Aktivität der p38-MAP-Kinase reduziert. Dies weist darauf hin, dass ERK und p38 unterschiedliche Effekte auf die NF- κ B-abhängige Genexpression haben (Carter & Hunninghake 2000).

Für die MAP-Kinasen MEK1/2, ERK1/2 und p38, bei denen der stärkste Effekt nach 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol-Exposition verzeichnet werden konnte, wurden

zusätzlich Kontrollversuche mit 10 mg/L Cholesterol durchgeführt, um auszuschließen, dass diese Effekte von Cholesterolen generell ausgelöst werden. Eine Inkubation von BV-2-Mikrogliazellen einzig mit Cholesterol hatte auf diese MAP-Kinasen keinerlei Aktivierungseffekt. Man kann also davon ausgehen, dass die Aktivierung der entsprechenden MAP-Kinasen tatsächlich durch die beiden Oxysterole 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol hervorgerufen wird.

5.4.1.3 *SAPK/JNK-Aktivierung durch Oxysterole*

Nach Exposition von BV-2-Mikrogliazellen mit 7-Ketocholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol kam es weiterhin nach nur 15 Minuten zu einer Phosphorylierung der durch oxidativen Stress induzierbaren MAP-Kinasen SAPK und JNK. Es folgte eine Zunahme der Phosphorylierung über eine Stunde mit anschließender Abnahme des Phosphorylierungsgrades über 15 Stunden, wobei hier kaum Unterschiede zwischen den beiden Oxysterolen auszumachen waren. Auch in diesem Fall ist es wieder möglich, dass die Kinasen MEK bzw. ERK vor dieser Kinase in der Signalkaskade wirken können. Um dies zu bestätigen, müssten die einzelnen Kinasen blockiert werden und anschließend die Wirkung auf SAPK und JNK untersucht werden.

JNKs sind sowohl an der Ausbreitung von aktivierten Mikroglia als auch an der Expression von proinflammatorischen Mediatoren wie zum Beispiel TNF- α , IL-6 oder MCP-1 involviert (Waetzig & Herdegen 2004). In den bereits erwähnten Untersuchungen des Rückenmarks aus EAE-Ratten von Shin et al. (2003) wurde für SAPK/JNK am 13. Tag der EAE ebenfalls eine starke Phosphorylierung beobachtet, wobei es mit dem Rückgang der Krankheit zu einer Abnahme des Phosphorylierungsgrades kam. Auch hier wurde eine geringere Beteiligung von Makrophagen deutlich erkennbar. So ging man davon aus, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen p-ERK, SAPK/JNK und p38 in T-Zellen und Makrophagen davon abhängig ist, in welcher Region sich die Zellen befinden (Shin et al. 2003).

Park et al. (2000) konnten zeigen, dass NO aus BV-2-Mikrogliazellen, welche mit INF- γ stimuliert wurden, den JNK/SAPK-Signalweg inhibiert. Der JNK/SAPK-Signalweg kann also, in Abhängigkeit vom Zelltyp, der Art des NO-Donors oder der Anwesenheit von anderen Stimuli sowohl positiv als auch negativ durch NO reguliert werden. Man nimmt an, dass dies durch S-Nitrosylierung des Signalproteins JNK1 geschieht (Park et al. 2000).

5.4.2 *Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an der Oxysterol-Signalkaskade*

Das Hauptziel von ERK1/2 ist unter anderem der sich im Zellkern befindende Transkriptionsfaktor Elk-1, welcher zur Aktivierung von c-fos führt (Koistinaho & Koistinaho 2002). Auf den

Transkriptionsfaktor Elk-1 hatte nur 7-Ketocholesterol einen Einfluss. Über eine Stunde kam es hier zu einer deutlichen Phosphorylierung, welche nachfolgend abnahm. Deora et al. (2000) beschreiben, dass NO in T-Lymphozyten über einen Ras-vermittelten Signalweg, an dem auch ERK beteiligt ist, Elk-1 aktivieren kann und so zu einer erhöhten Freisetzung von TNF- α mRNA führt. Dies wiederum bewirkt die Erhöhung der TNF- α Konzentration und nachfolgend eine Inflammation.

Andere Ziele des ERK1/2-Signalweges sind Proteine wie c-Myc, c-Jun, ATF-2 oder CREB (Adams & Sweatt 2002). Für den Transkriptionsfaktor CREB (Ser 133) (cAMP response element-binding protein) konnte jedoch nur für 25-Hydroxycholesterol eine stetige Aktivierung beobachtet werden, so dass man sagen kann, dass dieser Signalweg über die ERK1/2-Phosphorylierung erfolgt. Im Gegensatz dazu hatte 7-Ketocholesterol auf CREB (Ser133) keinerlei Effekt, bzw. konnte dieser über einen Zeitraum von 15 Stunden nicht gemessen werden.

Das Zusammenspiel von MAP-Kinasen ist sehr komplex und enthält verschiedene diskutierbare Möglichkeiten. Um eine Aussage hinsichtlich des genauen Signalweges machen zu können, bedarf es noch weiterer Untersuchungen, die sich auf die Ausschaltung bzw. Inhibierung der einzelnen Kinasen konzentrieren. Die nachfolgende Wirkung auf NO, Zytokine, Integrine und PARP-Aktivierung sollten hierbei bedacht werden.

5.4.3 Mikrogliale PARP-1-Aktivierung durch 7-Ketocholesterol

Während neuronaler Inflammation wandern aktivierte Mikroglia zum Entzündungsherd, phagozytieren dort die umliegenden Zellen und produzieren große Mengen freier Sauerstoffradikale, welche zur Zellschädigung und zum Zelltod führen können (Ullrich et al. 2001a). Infolge zellulärer Schädigung durch Sauerstoffradikale, alkylierenden Agenzien oder ionisierender Strahlung kommt es zu einer Aktivierung des Kernenzym Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) (Beneke et al. 2004). Dieses Enzym katalysiert die Anbindung von verzweigten Poly(ADP-Ribose)-Ketten an bestimmte Akzeptorproteine wie Histone, die Topoisomerasen I und II, DNA-Polymerase, p53 und die PARP selbst (Ullrich et al. 2001b).

Vielfach konnte gezeigt werden, dass die PARP-1 eine zentrale Rolle bei neuronalem Zelltod wie zum Beispiel unter Bedingungen der Ischämie in Zusammenhang mit Schlaganfall spielt. Eine exzitotoxische, neuronale Schädigung nach Ischämie im Gehirn führt zu einer Überaktivierung der PARP-1 und somit zum Verbrauch des NAD⁺. Dies bewirkt ein Aufbrauchen des ATP-Pools, was wiederum ein großes Energiedefizit nach sich zieht und zum neuronalen Zelltod führt (Bürkle 2001, Eliasson et al 1997, Ha & Snyder 2000). Es ist bekannt, dass DNA-Strangbrüche, welche durch DNA-schädigende Agenzien, wie freie Radikale, die bei oxidativer Schädigung von Mikrogliazellen

frei werden, im Zellkern zu einer schnellen Reaktion der PARP-1 führen (Cantoni et al. 1989, Reinheckel et al. 2000). Die PARP-1 spielt eine entscheidende Rolle beim Überleben von Mikrogliazellen während ihrer Aktivierung und macht sie somit zu einem potentiellen, antiinflammatorischen Ziel. Dies ermöglicht es aktivierten Mikroglia gegen oxidative Schädigung anzukommen und führt zu einer Heraufregulierung des Proteasoms im Kern (Ullrich et al. 2001a).

Verschiedene Studien zeigen, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B-abhängig ist von der PARP-1 (Hassa et al. 2001, Le Page et al. 1998, Oliver et al. 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass die PARP-1 eine Schlüsselrolle spielt bei der NF- κ B-abhängigen Expression von inflammatorischen Mediatoren aus Gliazellen während neuroimmunologischer Reaktionen (Chiarugi & Moskowitz 2003). Hierbei kann sie die Transkriptionsaktivität sowohl fördern als auch hemmen (d'Amours et al. 1999). Im Vorfeld dieser Arbeit konnte schon geklärt werden, dass es, nach Aktivierung mit nicht toxischen 7-Ketocholesterolkonzentrationen (10 mg/L), in Mikrogliazellen zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p65) in den Zellkern und zur Aktivierung der PARP-1 im Zellkern kommt (Diestel et al. 2003).

Zusammen mit der HMG-I(Y) ist die PARP-1 ein starker Aktivator von NF- κ B (Hassa et al. 2001, Ullrich et al. 2001b). PARP-1, HMG-I(Y) und NF- κ B-p65 bilden dabei einen Komplex und binden an die entsprechenden spezifischen DNA-Elemente (Butler & Ordahl 1999, Akiyama et al. 2001, Nirodi et al. 2001). Im Gegensatz dazu konnten Brown und Goldstein (1974) zeigen, dass 7-Ketocholesterol in humanen Fibroblasten die HMG-CoA hemmt. Außerdem wird beschrieben, dass es durch 7-Ketocholesterol zum Abbau der PARP kommen kann (Miguet-Alfonsi et al. 2002). In jedem Fall spielt die PARP-1 eine kritische Rolle bei der Aktivierung von Genen, die im engen Zusammenhang mit Stress und Inflammation stehen wie zum Beispiel IL-1 β , ICAM-1 oder iNOS. Alle drei haben eine NF- κ B-Bindungsstelle, werden jedoch zusätzlich von anderen PARP-1-abhängigen Transkriptionsfaktoren reguliert (Ha et al. 2002).

5.4.3.1 *PARP-1-Aktivierung im Zellkern*

7-Ketocholesterol bewirkt in Mikrogliazellen eine Aktivierung der PARP-1. So konnte in BV-2-Mikrogliazellen eine gesteigerte PARP-1-Aktivität schon innerhalb der ersten 30 Minuten nach der 7-Ketocholesterolexposition gemessen werden. Hierbei erhöht sich nach LPS-Voraktivierung der Aktivierungsgrad nur noch geringfügig, da die PARP-1-Aktivität in stimulierten Mikrogliazellen schon erhöht ist (Diestel et al. 2003). Während der Umwandlung von BV-2-Mikrogliazellen vom ruhenden in den aktivierten Status dringt 7-Ketocholesterol sehr schnell in den Zellkern ein und bewirkt dort eine Aktivierung der PARP-1. Durch die vorangegangene Aktivierung mittels LPS wird die Aufnahme von 7-Ketocholesterol zusätzlich verstärkt. Das lässt darauf schließen, dass

7-Ketocholesterol zwar die inflammatorische Reaktion von Mikrogliazellen nicht direkt auslöst, jedoch an der Aktivierung der Mikrogliazellen, welche ja zunächst noch inaktiv sind, beteiligt ist.

Da die PARP-1 an der Aktivierung von Mikrogliazellen beteiligt ist, stellte sich nun die Frage, in welchem Zusammenhang die Aktivierung der PARP-1 mit dem Eindringen von 7-Ketocholesterol in den Zellkern steht. Dafür wurde zunächst die Aktivität der PARP-1 in isolierten Kernen von BV-2-Mikrogliazellen über den Einbau von mit ^{32}P markierten NAD^+ bestimmt. Zu den Zellkernen wurde 7-Ketocholesterol in der Konzentration von 2 mg/L, wie sie in den Untersuchungen zur 7-Ketocholesterolakkumulation gemessen wurde (s. Abb. 4-4), zugegeben. Innerhalb einer Stunde stieg die PARP-1-Aktivität deutlich an, was darauf hinweist, dass die Wirkung von 7-Ketocholesterol direkt im Zellkern erfolgt.

5.4.3.2 *PARP-1-Aktivierung durch 7-Ketocholesterol-vermittelte DNA-Schädigung*

In eukaryotischen Zellen kommt es nach Schädigung von DNA zur Aktivierung der PARP-1 (Bürkle 2001). Auch im Zellkern von BV-2-Mikrogliazellen hat 7-Ketocholesterol scheinbar einen schädigenden Effekt auf die DNA, da es zu einer PARP-1-Aktivierung kam. Es galt nun noch herauszufinden, ob dies auch wirklich durch DNA-Schädigung passiert. Das war möglich mittels einer Untersuchung der Wirkung von 7-Ketocholesterol auf isolierte rekombinante PARP. Diese wurde zusammen mit 7-Ketocholesterol in Anwesenheit und Abwesenheit von DNA inkubiert und über den Einbau von mit ^{32}P markierten NAD^+ auf ihre Aktivität hin untersucht. Eine Inkubation von isolierter rekombinanter PARP-1 mit sonifizierter DNA bewirkte - wie zu erwarten - eine sehr schnelle Aktivierung innerhalb weniger Minuten. Eine Aktivierung erfolgte ebenfalls bei der Inkubation von rekombinanter PARP-1 mit DNA und 7-Ketocholesterol. Nach einer kurzen Lag-Phase von etwa 10 Minuten erreichte die Poly(ADP-Ribosyl)ierung, induziert durch 7-Ketocholesterol, in Gegenwart von DNA ein Ausmaß, wie es bei einer Einzelstrang-DNA zu beobachten war. Dies beweist, dass 7-Ketocholesterol dieses Enzym über Schädigung der DNA aktiviert. 7-Ketocholesterol allein war nicht in der Lage, die PARP-1 zu aktivieren.

In den Arbeiten von Diestel et al. (2003) wurde schon bewiesen, dass eine Herunterregulierung der PARP-1 vor neuronaler Schädigung durch 7-Ketocholesterol schützt. Da, wie oben angeführt, die PARP-1 ein „downstream“-Ziel von der *in vivo* Konzentration von 2mg/L 7-Ketocholesterol ist, wurde die Unterdrückung der PARP-1 hier mittels eines Antisense-PARP-1-pcDNA3.1-Vektors untersucht. Die Einwanderung von Antisense-PARP-1-BV-2 Mikrogliazellen bewirkt im Zusammenhang mit 7-Ketocholesterol einen verminderten Zelltod innerhalb der neuronalen Schichten von hippokampalen Schnittkulturen. (Diestel et al. 2003) Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die durch 7-Ketocholesterol induzierte PARP-1-Aktivierung in Mikrogliazellen an der

Stärke der neuronalen Schädigung nach inflammatorischem Abbau und oxidativer Modifizierung von Cholesterol aus den Myelinscheiden bzw. Zellmembranen beteiligt ist. Auch Ha et al. (2002) konnten zeigen, dass es in PARP-1 $-/-$ Gliazellen zu einem Absinken verschiedener Transkriptionsfaktoren und nachfolgend zu einer verringerten Expression von Zytokinen und zellulären Adhäsionsmolekülen kommt. Auf diese Weise werden PARP-1 $-/-$ Mäuse vor bestimmten Formen der Inflammation geschützt (Ha et al. 2002).

Die Inhibierung der PARP-1 hat eine bemerkenswerte Wirkung in experimentellen Modellen für Diabetes, Inflammation, Schock und neuronalen Zelltod. Jedoch kann eine Inhibierung der PARP-1 nicht immer die Reduktion des NAD^+ - und ATP-Pools verhindern (Chiarugi 2002, Goto et al. 2002). So beschrieben zum Beispiel Shieh et al. (1999), dass PARP $-/-$ Fibroblasten während der Exposition mit DNA-schädigenden Agenzien die gleiche NAD^+ -Verminderung bewirken wie PARP $+/+$ Fibroblasten. Mehrere Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass unter bestimmten Bedingungen die vorteilhafte Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung unabhängig vom Energieverlust ist (Chiarugi 2002). Interessanterweise kann die Inhibierung der PARP-1 zu einer Überexpression MDR-1 (Multidrug Resistance Transporter) führen, die eine gesteigerte Ausstoßung von genotoxischen Stoffen aus der Zelle bewirkt (Wurzer et al. 2000).

5.4.3.3 *Zusammenhang zwischen NO, PARP und Zytokinen*

Peroxynitrit kann Makromoleküle schädigen und so zur Oxidation von DNA, Einzelstrangbrüchen von DNA, Lipidperoxidation, Bildung von Proteincarbonylen und Oxidation von Aminosäuren führen (Giasson et al. 2002). Durch die Schädigung der DNA kann Peroxynitrit, und somit indirekt NO, auch die PARP aktivieren (Scott et al. 2003). Man kann also annehmen, dass 7-Ketocholesterol, wie gezeigt wurde, die PARP nicht nur direkt aktiviert, sondern diese Aktivierung möglicherweise in der Zelle auch über NO und Peroxynitrit noch verstärkt wird.

In der Arbeit von Diestel et al. (2003) konnte eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in BV-2-Mikrogliazellen nach Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol gezeigt werden. Die NF- κ B-Untereinheit p50 bindet zusammen mit HMG-I(Y) als ternärer Komplex an die Promoter/Enhancer-Region der iNOS. Dies vollzieht sich allerdings außerhalb der NF- κ B-Bindestelle und somit ist dieser Komplex ein kritischer Regulator der transkriptionellen Hochregulierung der iNOS durch inflammatorische Stimuli (Perrella et al. 1999). Ebenfalls als Co-Aktivator für NF- κ B wird die PARP-1 diskutiert (Diestel et al. 2003, Hassa et al. 2001, Ullrich et al. 2001b). Eine Ausschaltung der PARP-1 mittels eines Antisense-Vektors in BV-2-Zellen bewirkt eine Unterdrückung der Produktion der Integrine CD11a und ICAM-1 nach der Exposition mit 10 mg/L 7-Ketocholesterol (Diestel et al. 2003). Dies wurde allerdings noch nicht in Bezug auf die iNOS überprüft. Man könnte hier auf

Grund der vorliegenden Daten und Literatur vermuten, dass die PARP-1 auch in diesen Prozess involviert ist. Nachdem die PARP also durch 7-Ketocholesterol aktiviert wird, kann es zusätzlich zu einer Verstärkung der Aktivierung durch NO bzw. der Bildung von Peroxynitrit kommen. In **Abbildung 5-1** soll noch einmal der Zusammenhang zwischen oxidativen und inflammatorischen Stresssignalwegen zusammengefasst werden.

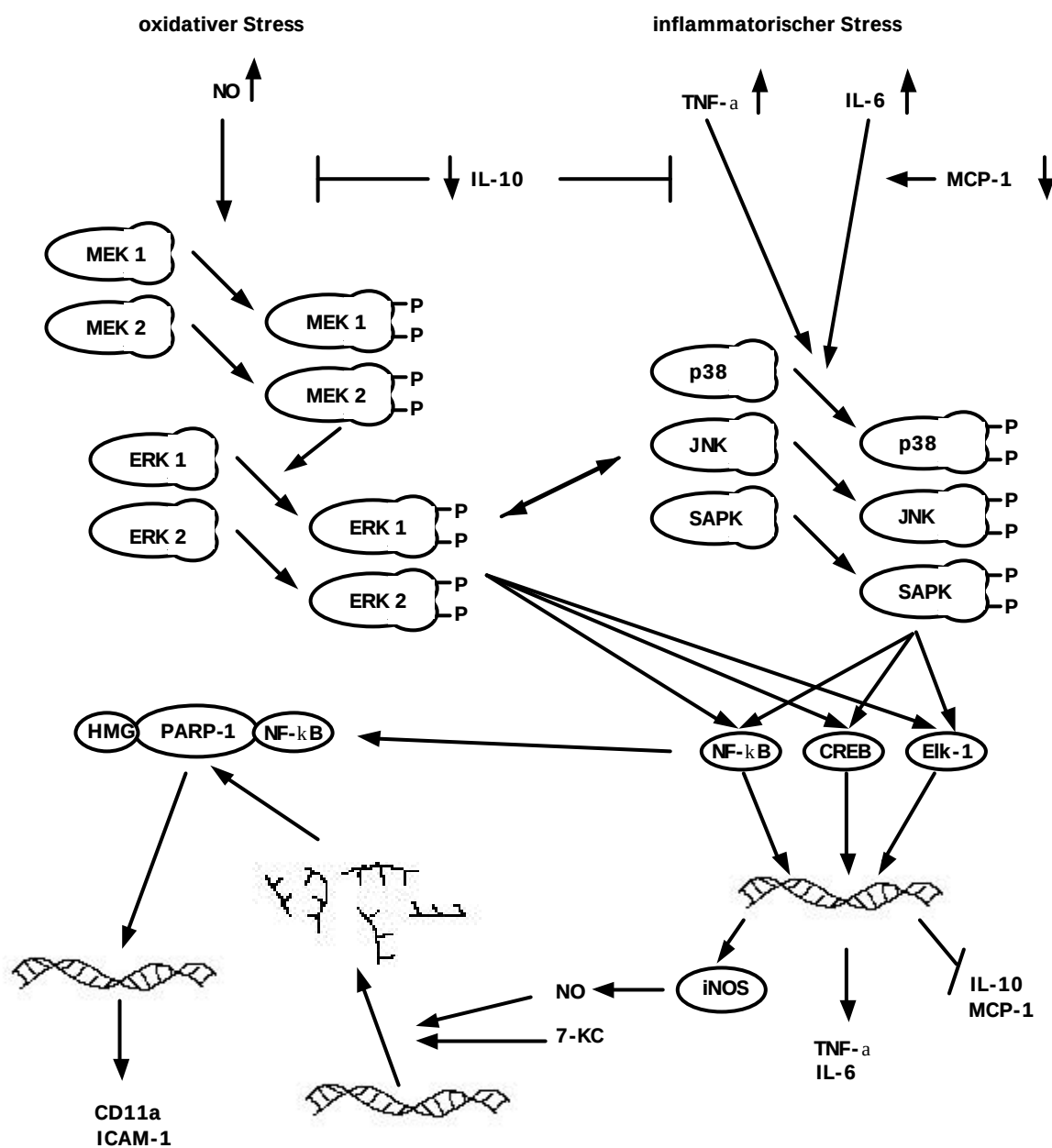


Abbildung 5-1: Übersicht über die durch 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol ausgelösten inflammatorischen Signalwege.

Ein bedeutender Effektormechanismus im Zusammenhang mit der Pathogenese von inflammatorischen Krankheiten des ZNS ist die Induktion der NO-Synthetase durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (Brosnan et al. 1995, Parkinson et al. 1997). Für diese Zytokine wurde gezeigt, dass sie in Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten von Nagern die NOS aktivieren (Murphy et al. 1993). TNF- α kann in dafür anfälligen Zellen Apoptose auslösen und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezien anregen (Koutsilieri et al. 2002). Hemmer et al. (2001) beschreiben, dass TNF- α die neuronale Sensitivität für NO steigert. Bei einigen Autoimmunkrankheiten, einschließlich Multipler Sklerose, kann ein schädigender proinflammatorischen Zyklus zu einem chronischen Krankheitsverlauf führen. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass NO und/oder Peroxynitrit direkt an der Hochregulation der Produktion von IL-1 β , TNF- α und IL-8 in Makrophagen beteiligt sind (Parkinson et al. 1997). 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol können also durch die Produktion von NO und Zytokinen zu einem sich selbst erhaltenden und potenzierenden inflammatorischen Kreislauf führen.

5.4.4 Veränderte Genexpression durch 7-Ketocholesterol

Die unter 4.4.3 dargestellten Daten zeigen, dass 7-Ketocholesterol in einer Konzentration, wie sie auch im Liquor von Multiple-Sklerose-Patienten zu finden ist, in BV-2-Mikroglia schon nach 30 Minuten die Expression einer Vielzahl von Genen hochreguliert. Mehr als 500 Gene wurden um den Logarithmus von mindestens 2 bzw. -2 hoch- bzw. herunterreguliert. Das Hauptaugenmerk soll in dieser Arbeit jedoch auf die Gene gerichtet sein, welche besonders im Bereich der Inflammation und Signaltransduktion wirksam sind und unter denen sich die am stärksten beeinflussten Gene (s. Tabelle 4-2 und 4-4) befinden.

5.4.4.1 Verstärkte Genexpression in BV-2-Mikroglia

Besonders auffällig ist die veränderte Expression für die Gene des Komplementsystems. Das Komplementsystem ist eine wichtige Komponente der angeborenen und adaptiven Immunantwort und ist von Bedeutung bei zellulären und inflammatorischen Veränderungen während der MS und der EAE. Seine genaue Rolle ist jedoch noch nicht genau geklärt (Davoust et al. 1999). Nach der Exposition mit 7-Ketocholesterol kommt es zu einer Hochregulation der **C1qb (complement component 1, subcomponent q)** bereits nach 30 Minuten um das 7fache. Darüber hinaus sieht man, dass sich die Expression von **IL-1a** schon nach 30 Minuten verdoppelt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass IL-1 nicht in der β -Form, sondern in der α -Form in den Inflamationsprozess, der durch 7-Ketocholesterol vermittelt wird, involviert ist.

Zu den am stärksten hochregulierten Genen gehören auch zwei Proteine, die der S100-Familie angehören. S100-Proteine sind als Mediatoren der Kalzium assoziierten Signaltransduktion von Interesse und erfahren eine veränderte subzelluläre Verteilung als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli. Sie werden besonders während Entzündungen und zellulärem Stress hochexprimiert (Eckert et al. 2004). Nach Zugabe von 7-Ketocholesterol kam es zu einem Anstieg um das 9fache bzw. 6,5fache für die S100-Proteine **S100a6 (Calcyclin)** bzw. **S100a8 (Calgranulin A)** nach 30 Minuten. S100a6 kann durch TNF- α über NF- κ B aktiviert werden (Joo et al. 2003) und ist möglicherweise eine Folge der erhöhten TNF- α - und NF- κ B-Expression bzw. -Aktivierung. Auch S100a8 wird im Zusammenhang mit vielen Zytokinen diskutiert (McLachlan et al. 2004).

Unter den ersten 20 hochregulierten Genen fand sich auch ein Rezeptor erhöht, der in der Lage ist, LDL zu binden. Hierbei handelt es sich um den **Makrophagenrezeptor mit Kollagenstruktur (MARCO)**. Dies ist ein als Scavengerrezeptor fungierendes Membran-Glycoprotein, wie es im Menschen als auch in der Maus identifiziert wurde. Auch aktivierte Mikroglia sind in der Lage, diesen Rezeptor erhöht zu exprimieren (Granucci et al. 2003). Da angenommen wird, dass dieser Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt (Groulleau et al. 2003), kann man davon ausgehen, dass er auch an dem Signalweg, der durch 7-Ketocholesterol ausgelöst wird, beteiligt ist. Die Exposition mit 7-Ketocholesterol bewirkte bei diesem Rezeptor eine um das 9,5fache erhöhte Genexpression in BV-2-Mikrogliazellen.

Das Transportprotein **Apolipoprotein E (ApoE)** ist ein sehr gut charakterisiertes Protein, welches an der Regulation des Cholesterol und Fettstoffwechsels beteiligt ist. Unter den Apolipoproteinen wird diesem eine fundamentale Rolle sowohl am normalen neuronalen Stoffwechsel als auch bei der Reparatur nach Hirnschädigungen zugeschrieben (Holtzmann und Fagan 1998, Evangelou et al. 1999). In BV-2-Mikrogliazellen erfolgte hier nach Zugabe von 7-Ketocholesterol eine Expressionssteigerung um mindestens das 5fache. Es gibt Studien, die zeigen, dass dieses Protein im Zusammenhang mit einem gesteigerten Risiko für die Entstehung von MS steht (Evangelou et al. 1999). ApoE ist weiterhin in der Lage, die NO-Produktion zu regulieren (Colton et al. 2002) und ist an dem Scavenging von zerstörten Myelin durch Makrophagen beteiligt (Carlin et al. 2000).

5.4.4.2 Verringerte Genexpression in BV-2 Mikroglia

Unter den herunterregulierten Genen befanden sich interessanterweise viele, die an der Inflammation und Immunantwort beteiligt sind. So werden die beiden Chemokine **RANTES (CCL5)** und **MCP-1 (CCL2)** bereits nach 30 Minuten deutlich herunterreguliert. Beide spielen eine Rolle während der Multiplen Sklerose (Bartosik-Psujek und Stelmasiak 2004). Für MCP-1 konnte dies schon mittels ELISA in BV-2 für 25-Hydroxycholesterol nachgewiesen werden. Eine Reihe von

Chemokinen wird ebenfalls im Zusammenhang mit 7-Ketocholesterol um mindestens den Logarithmus 2 herunterreguliert, dazu gehören **CXCL10 (IP-10 - IFN inducible protein 10)**, **CCL6 (C10/SYCA6)**, **CCL7 (MCP-3)**, **CCL4 (MIP-1b)**, **CCL12 (MCP-5)** und **CCL3 (MIP-1a)**. Der Großteil dieser Chemokine wird im ZNS während der MS und EAE exprimiert (Kalyvas und David 2004). Auch **IL-7R**, der Rezeptor für IL-7, wird bereits nach einer halben Stunde schon um das 13fache herunterreguliert. IL-7 und sein Rezeptor sind von Bedeutung bei der Pathogenese von MS. IL-7 steigert hierbei die T-Zellproliferation und Reaktivität zu Myelinantigenen in MS und EAE. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Daten für Mikroglia wird die DNA dieses Rezeptors bei Patienten mit RRMS (relapsing-remitting MS) hochreguliert (Teutsch et al. 2003). In diesem Fall hat 7-Ketocholesterol auf Mikroglia eine umgekehrte Wirkung. In Mikroglia wirkt dieser Faktor so der inflammatorischen Wirkung der einzelnen Chemokine entgegen.

Viele dieser Chemokine können die Expression oder Aktivierung der **Phospholipase A₂ (PLA A₂)** bewirken. Aber auch dieses Enzym wird, wahrscheinlich infolge der verringerten Expression dieser Chemokine, in BV-2-Mikroglia um das 33fache nach 30 Minuten herunterreguliert. Einige der metabolischen Produkte der PLA A₂ können proinflammatorisch wirken, während andere Myelinabbau, Demyelinisierung und Chemokin/Zytokin-Expression bewirken (Kalyvas und David 2004). Somit liegt die Vermutung nahe, dass 7-Ketocholesterol in Mikroglia auch eine protektive Wirkung auslöst hinsichtlich der Multiplen Sklerose. Kalyvas und David (2004) beschrieben die PLA A₂ jedoch als hochexprimiert in Läsionen der EAE.

Interessanterweise kommt es zu einer Herunterregulation des **CD36 Antigens**. CD36 ist ein Scavenger Rezeptor, der vorwiegend auf Makrophagen und Monozyten exprimiert wird. Bei der Herunterregulation der Expression kann es ebenfalls zur verminderten CD36-Antigen-Expression kommen. Schließt sich diesem Vorgang dann eine Hochregulierung von CD36 an, folgt das Antigen diesem Effekt nur leicht (Yesner et al. 1996). Es lässt sich also nicht ausschließen, dass dieser Rezeptor dennoch an dem durch 7-Ketocholesterol vermittelten Signalweg beteiligt ist. So ließ sich beispielsweise eine eindeutige gesteigerte iNOS-Expression nachweisen, während die Array-Daten zeigen, dass die Genexpression herunterreguliert wurde.

Baranzini und Hauser (2002) zeigten eine erhöhte Expression für die **Prostaglandin-D-Synthase**. In BV-2-Mikrogliazellen konnte nach 7-Ketocholesterolexposition lediglich eine verringerte Expression für dieses Enzym nachgewiesen werden. Diese hier dargestellten Daten können nur ein Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen, die sie bestätigen, sein.

5.5 Ausblick und Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass in Gehirnen und dem Liquor von Multiple-Sklerose-Patienten bestimmte Oxysterole erhöht auftreten. Besonders herausragend hierbei war 7-Ketocholesterol, aber auch 25-Hydroxycholesterol. Beide Oxysterole können beim Abbau der Myelinschicht, einem Vorgang, der kennzeichnend ist für Multiple Sklerose, entstehen. 7-Ketocholesterol war auch in Gehirnen bei Patienten mit akuter Multipler Sklerose und während der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis zu finden. Dieses Oxysterol aktiviert Mikrogliazellen, die eben jenes wiederum akkumulieren und abbauen. Gleichzeitig werden von den Mikrogliazellen, über die Aktivierung von MAP-Kinase-Signalwege, Botenstoffe wie NO bzw. Peroxynitrit und TNF- α gebildet, die eine Kommunikation zwischen Mikrogliazellen und Neuronen vermitteln. Eine von 7-Ketocholesterol abhängige Wechselwirkung zwischen den beiden Zellarten wurde in dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen. Mit der Zerstörung der Myelinschicht und der Freisetzung von Abbauprodukten, wie 7-Ketocholesterol oder 25-Hydroxycholesterol, und der Aktivierung von Mikrogliazellen wird ein sich selbst erhaltender Mechanismus in Gang gesetzt.

Von Popovic et al. (2002) wurde erst kürzlich die Inhibierung von EAE durch Tetracycline beschrieben. Eine besondere Rolle spielte hierbei das Monocyclin, das den Krankheitsverlauf stark hemmt. Dies geschieht unter anderem, wie in diesen Arbeiten gezeigt wurde, durch Inhibierung der mikroglialen Aktivierung und der Expression der Metalloproteinase 2 und geht einher mit einer verringerten Inflammation und Demyelinisierung. Als Konsequenz der Wirkung dieses Tetracyclin kommt es ebenfalls zu einer Inhibierung der iNOS- und p38-Aktivität. Monocyclin wird deshalb als antiinflammatorisches Medikament mit neuroprotektiver Wirkung beschrieben und als Möglichkeit zur Behandlung der RRMS diskutiert (Nessler et al. 2002, Popovic et al. 2002, Zhu et al. 2002).

In Mikrogliazellen ruft 7-Ketocholesterol durch DNA-Schädigung eine Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)Polymerase hervor. Diese bindet zusammen mit NF- κ B und der HMG-CoA-Reduktase an spezifische mRNA, die dann wieder die Expression von Integrinen wie CD11a oder ICAM-1 bewirkt. Solche Integrine ermöglichen es den Mikroglia einerseits zum Ort der neuronalen Schädigung zu wandern und dort Zellschäden zu beseitigen andererseits aber auch den Zellschaden zu verstärken. An dieser Stelle könnte sich ein Ansatz mittels Statinen als in doppelter Hinsicht interessant erweisen. Sie werden häufig in der medizinischen Praxis als Lipidsenker eingesetzt. Die geschieht über die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase. Zudem konnte man zeigen, dass Statine die Induktion der MHC-II-Expression durch IFN- γ inhibieren und somit einen Einfluss auf die Immunantwort haben (Kwak et al. 2000).

Die untersuchten Oxysterole haben einen Einfluss auf verschiedene Zytokine und Chemokine:

TNF- α und IL-6 werden hoch-, IL-10 und MCP-1 dagegen herunterreguliert. Die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α kann durch Phosphodiesterase-4-Inhibitoren wie Roflumilast, beeinflusst werden. In Monozyten, Makrophagen und Nervenzellen geschieht dies durch die Hemmung des Abbaus von cAMP (Hatzelmann & Schudt 2001, Ullrich & Zipp 2004).

Eine weitere Methode, die für die Behandlung von Multipler Sklerose diskutiert wird, ist die Verwendung von CCR1-Antagonisten. Teilweise konnten hier schon erste Erfolge am EAE-Mausmodell erzielt werden (Elices 2002, Liang et al. 2000). Der Chemokinrezeptor CCR-1, an den die Chemokine MIP-1 α , RANTES und MCP-3 binden können, wurde auf Makrophagen und Mikrogliazellen in MS-Läsionen gefunden (Balashov et al. 1999). Da, wie gezeigt wurde, 7-Ketocholesterol ebenfalls die Produktion unter anderem dieser Chemokine herunterreguliert, stellt sich jedoch die Frage, ob ein Konzept zur direkten Hemmung der 7-Ketocholesterolproduktion Sinn machen würde. Dadurch, dass die Aktivierung von Mikroglia während Multipler Sklerose auch protektiv wirkt, könnte es auch von Vorteil sein, diese bis zu einem gewissen Grad aufrecht zu erhalten und lediglich an bestimmten Stellen der entstehenden Inflammation einzugreifen.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dem Demyelinisierungsprozess durch Anregung regenerativer Prozesse entgegenzuwirken. Diesbezüglich werden embryonale Stammzellen diskutiert. Sich selbst erneuernde, totipotente embryonale Stammzellen könnten als unbegrenzte Quelle bei Transplantationen dienen. Am Modell für Myelinkrankheiten (der Ratte) konnte gezeigt werden, dass diese Stammzellen mit Neuronen interagieren und effizient Axone im Gehirn und Rückenmark myelinisieren (Brustle et al. 1999). Basierend auf solchen Studien wurden teilweise schon Knochenmarkstransplantationen mit autologen, hematopoetischen Stammzellen an Multiple-Sklerose-Patienten der Phase I/II durchgeführt. Allerdings lag hier eine relativ hohe Letalität von ca. 5 % vor, die wahrscheinlich auf die Komplexität der Krankheit zurückzuführen ist (Fassas et al. 2002).

Letztendlich können Oxysterole wie die hier vorgestellten 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol und die entsprechenden mikroglialen Aktivierungsmerkmale auch als Marker für die Krankheitsanalyse von Multipler Sklerose in Betracht gezogen werden. Als vielversprechender axonaler Marker wird zur Zeit die leichte Kette der Neurofilamente diskutiert, während die schwere Kette in Zusammenhang mit dem Voranschreiten der Krankheit betrachtet wird. Andere Studien haben Veränderung im Tauprotein, Actin, Tubulin und sogar des Oxysterols 24S-Hydroxycholesterol gezeigt. Diese Konzepte können hilfreich sein zur Erforschung von Biomarkern in verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten (Teunissen et al. 2005).

Literaturverzeichnis

ADAMCHIK Y., FRANTSEVA M.W., WEISSPAPIR M., CARLEN P.L. AND PERZ VELAZQUEZ J.L., 2000: Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research Protocols* 5, 153-158

ADAMS J.P. AND SWEATT J.D., 2002: Molecular psychology: Role for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 42, 135-163

AKIYAMA T., TAKASAWA S., NATA K., KOBAYASHI S., ABE M., SHERVANI N.J., IKEDA T., NAKAGAWA K., UNNO M., MATSUNO S. AND OKAMOTO H., 2001: Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing β -cell regeneration: Poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosylation). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98, 48-53

ALLAN S.M. AND ROTHWELL N.J., 2001: Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 734-744

ALLEGRETTA M., NICKLAS J.A., SRIRAM S. AND ALBERTINI R.J., 1990: T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 247, 718-721

ALOISI F., 2001: Immune function of microglia. *Glia* 36, 165-179

AMBROSINI E. AND ALOISI F., 2004: Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochemistry Research* 29, 1017-1038

ANDERSON J.K., 2004: Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? *Nature Medicine* 10, 18-25

AXELSON M. AND LARSSON O., 1995: Low density lipoprotein (LDL) cholesterol is converted to 27-hydroxycholesterol in human fibroblasts. Evidence that 27-hydroxycholesterol can be important intracellular mediator between LDL and the suppression of cholesterol production. *Journal of Biological Chemistry* 270, 15102-15110

AYERS M.M., HAZELWOOD L.J., CATMULL D.V., WANG D., MCKORMACK Q., BERNARD C.C. AND ORIAN J.M., 2004: Early glial response in murine models of multiple sclerosis. *Neurochemistry International* 45, 409-419

BANATI R.B., GEHRMANN J., SCHUBERT P. AND KREUZBERG G.W., 1993: Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7, 111-118

BANCHEREAU J., BRIERE F., CAUX C., DAVOUST J., LEBECQUE S., LIU Y.J., PULENDRAN B. AND PALUCKA K., 2000: Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 18, 767-811

BARANZINI S.E., ELFSTROM C., CHANG S.-Y., BUTUNOI C., MURRAY R., HIGUCHI R AND OKSENBERG J.R., 2000: Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *The Journal of Immunology* 165, 6576-6582

BARANZINI S.E. AND HAUSER S.L., 2002: Large scale gene-expression studies and the challenge of multiple sclerosis. *Genome Biology* 3, 1-5

BÄRLOCHER F., 1999: Biostatistik. Thieme Verlag Stuttgart

BARONE F.C. AND **FEUERSTEIN C.Z.**, 1999: Inflammatory mediators and stroke: New opportunities for novel therapeutics. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19, 819-834

BARTOSIK-PSUJEK H. AND **STELMASIAK Z.**, 2004: Steroid therapy altered serum levels of CCL2 and CCL5 chemokines in multiples sclerosis patients during relapse. *European Neurology* 52, 237-241

BEFFERT U., **DANIK M.**, **KRZYWKOWSKI P.**, **RAMASSAMY C.**, **BERRADA F.** AND **POIRIER J.**, 1998: The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* 27, 119-142

BEGOLKA W.S., 1998: Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinical distinct models of multiple sclerosis. *Journal of Immunology* 161, 4437-4446

BENEKE S., **DIEFENBACH J.** AND **BURKLE A.**, 2004: Poly(ADP-ribosyl)ation inhibitors: Promising drug candidates for a wide variety of pathophysiologic conditions. *International Journal of Cancer* 111, 813-816

BENOIST C. AND **MATHIS D.**, 2002: Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 420, 875-878

BENVENISTE E.N., 1997: Role of macrophage / microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Molecular Medicine* 75, 165-173

BHAT N.R., **ZHANG P.**, **LEE J.C.**, **HOGAN E.L.**, 1998: Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumour necrosis factor- α gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *Journal of Neuroscience* 18, 1633-1641

BIJARTMAR C., **KIDD G.**, **MÖRK S.**, **RUDICK R.** AND **TRAPP B.D.**, 2000: Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology* 48, 893-901

BISCHOFF P.L., **HOLL V.**, **COELHO D.**, **DUFOUR P.**, **LUU B.** AND **WELTIN D.**, 2000: Apoptosis at the interface of immunosuppressive and anticancer activities the examples of two classes of chemical inducers, oxysterols and alkylating agents. *Current Medicinal Chemistry* 7, 693-713

BJÖRKHEM I., 2002: Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *Journal of Clinical Investigation* 110, 725-730

BJORKHEM I. AND **MEANEY S.**, 2004: Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 24, 806-815

BLASI E., **BARLUZZI R.**, **BOCCHINI V.**, **MAZZOLLA R.** AND **BISTONI F.**, 1990: Immortalisation of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology* 27, 229-237

BOURTCHULADZE R., **FRENGUELLI B.**, **BLENDY J.**, **CIOFFI D.**, **SCHUTZ G.** AND **SILVA A.J.**, 1994: Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding Protein. *Cell* 79, 59-68

BRADL M AND HOHLFELD, 2003: Molecular pathogenesis of neuroinflammation. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 74, 1364-1370

BROCKE S., GAUR A., PIERCY C., GAUTAM A., GIJBELS K., FATHMAN C.G. AND STEINMAN L., 1993: Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 365, 642-644

BROUWERN., ZUURMAN M.W., WIE T., RANSOHOFF R.M., BODDEKE H.W. AND BIBER K., 2004: Induction of glial L-CCR mRNA expression in spinal cord and brain in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 46, 84-94

BROSANAN C.F., CANNELLA B., BATTISTINI L. AND RAINE C.S., 1995: Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: Correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* 45, 16-21

BROWN A.J., DEAN R.T. AND JESSUP W., 1996: Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophage. *Journal of Lipid Research* 37, 320-335

BROWN M.S. AND GOLDSTEIN J.L., 1974: Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblast by 7-ketocholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7306-7314

BRÜCK W., KUHLMANN T. AND STADELMANN, 2003: Remyelination in multiple sclerosis. *Journal of Neurological Science* 206, 181-185

BRUSTLE O., JONES K.N., LEARISCH R.D., KARRAM K., CHOUDHARY K., WIESTLER O.D., DUNCAN I.D. AND MCKAY R.D., 1999: Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285, 754-756

BÜRKLE A., 2001: Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *BioEssays* 23, 795-806

BUTLER A.J. AND ORDAHL C.P., 1999: Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Molecular Cell Biology* 19, 296-306

CALABRESE V., BATES T.E. AND GIUFFRIDA STELLA A.M., 2000: NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: The role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochemical Research* 25, 1315-1341

CANNELLA B. AND RAINE C.S., 1995: The adhesion molecule/cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology* 37, 424-

CANTONI O., CATTABENI F., STOCCHI V., MEYN R.E., CERUTTI P. AND MURRAY D., 1989: Hydrogen peroxide insult in cultured mammalian cells: relationships between DNA single-strand breakage, poly(ADP-ribose) metabolism and cell killing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1014, 1-7

CARLIN C., MURRAY L., GRAHAM D., DOYLE D. AND NICOLL J., 2000: Involvement of apolipoprotein E in multiple sclerosis: absence of remyelination associated with possession of the APOE epsilon2 allele. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 59, 361-367

CARSON M.J., 2002: Microglia as liaisons between the immune and central nervous system: Functional implications for multiple sclerosis. *Glia* 40, 218-231

CARTER A.B. AND HUNNINGHAKE G.W., 2000: A constitutive active MEK→ ERK pathway negatively regulates NF-κB-dependent gene expression by modulating TATA-binding protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 27858-27864

CARTER A.B., KNUDTSON K.L., MONICK M.M. AND HUNNINGHAKE G.W., 1999: The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-κB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *Journal of Biological Chemistry* 274, 30858-30863

CHAN E.D., WINSTON B.W., UH S.-T., WYNES M.W., ROSE D.M. AND RICHES D.W.H., 1999: Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinases in the expression of inducible nitric oxide synthase by IFN-γ and TNF-α in mouse macrophages. *Journal of Immunology* 162, 415-422

CHANG J.Y., CHAVIS J.A., LIU L.-Z. AND DREW P.D., 1998c: Cholesterol oxides induce programmed cell death in microglial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249, 817-821

CHANG J.Y. AND LIU L.-Z., 1998: Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochemistry International* 31, 317-323

CHANG J.Y. AND PHELAN K.D., 2002: The effects of oxysterols on cells of the nervous system. FLIESLER S.J. (Editor): *Sterols and oxysterols: Chemistry, biology and pathobiology*. Research Signpost

CHANG J.Y., PHELAN K.D. AND CHAVIS J.A., 1998b: Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on sympathetic neurons. *Brain Research Bulletin* 45, 615-622

CHANG J.Y., PHELAN K.D. AND LIU L.-Z., 1998a: Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on NGF-differentiated PC12 cells. *Neurochemical Research* 23, 7-16

CHAVARRIA A. AND ALCOCER-VARELA J., 2004: Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmunity Reviews* 3, 251-260

CHIARUGI A., 2002: Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 23, 122-129

CHIARUGI A. AND MOSKOWITZ A., 2003: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-κB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry* 85, 306-317

CHICOYE E., POWRIE W.D. AND FENNEMA O., 1968: Synthesis, purification and characterization of 7-ketocholesterol and epimeric 7-hydroxycholesterol. *Lipids* 3, 551-556

CHIUEH C.C., 1999: Neuroprotective properties of nitric oxide. *Annals New York Academy of Science* 890, 301-311

COLTON C.A., BROWN C.M., COOK D, NEEDHAM L.K., XU Q., CZAPIGA M., SAUNDERS A.M., SCHMECHEL D.E., RASHEED K. AND VITEK M.P., 2002: APOE and the regulation of microglial nitric oxide production: a link between genetic risk and oxidative stress. *Neurobiology of Aging* 23, 777-785

- COMBS C.K.**, JOHNSON D.E., CANNADY S.B., LEHMAN T.M. AND LANDRETH G.E., 1999: Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of betaamyloid and prion proteins. *Journal of Neuroscience* 19, 928-939
- CROSS A.K.** AND WOODROOFE M.N., 2001: Immunoregulation of microglial functional properties. *Microscopy Research and Technique* 54, 10-17
- CUZZOCREA S.**, CHATTERJEE P.K., MAZZON E., DUGO L., DE SARRO A., VAN DE LOO F.A., CAPUTI A.P. AND THIEMERMANN C., 2002: Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. *Shock* 18, 169-176
- CYSTER J.G.**, 1999: Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *Journal of Experimental Medicine* 189, 447-450
- DAILEY M.E.** AND WAITE M., 1999: Confocal imaging of microglial cell dynamics in hippocampal slice culture. *Methods* 18, 222-230
- D'AMOURS D.**, DESNOYERS S., D'SILVA I. AND POIRIER G.G., 1999 : Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemistry Journal* 342, 249-268
- DANIK M.**, CHAMPANGE D., PETIT-TURCOTTE C., BEFFERT U. AND POIRIER J., 1999 : Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Critical Review of Neurosurgery* 13, 357-407
- DAVIS R.J.**, 1995: Transcriptional regulation by MAP-kinases. *Molecular Reproduction and Development* 42, 459-467
- DAVIS J.B.** AND MAHER P., 1994: Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Research* 652, 169-173
- DAVOUST N.**, NATAF S., REIMAN, R., HOLERS M.V., CAMPBELL I.L. AND BARNUM S.R., 1999: Central nervous system-targeted expression of the complement inhibitor sCrry prevents experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 163, 6551-6556
- DEL RIO-HORTEGA P.**, 1932: Microglia. In: Penfield W., editor. *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. New York: P.B. Hoeber 481-534
- DEL ZOPPO G.**, GINIS I., HALLENBECK J.M., IADECOLA C., WANG X. AND FEURERSTEIN G.Z., 2000: Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathology* 10, 95-112
- DE MURCIA G.** AND SHALL S., 2000: Poly(ADP-ribosylation) reactions. From DNA damage and stress signalling to cell death. Oxford University Press
- DEORA A.A.**, HAJJAR D.P. AND LANDER H.M., 2000: Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. *Biochemistry* 39, 9901-9908
- DE STEFANO M.**, GUIDI L., STROMILLO M.L., BARTOLOZZI M.L. AND FEDERICO A., 2003: Imaging neuronal and axonal degeneration in multiple sclerosis. *Neurological Science* 24, 283-286
- DICKENS M.**, ROGERS J.S., CAVANAGH J., RAITANO A., XIA Z., HALPERN J.R., GREENBERG M.E., SAWYERS C.L. AND DAVIS R.J., 1997: A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277, 693-696

- DIESTEL A.**, AKTAS O., HACKEL D., HÄKE I., MEIER S., RAINE C.S., NITSCH R., ZIPP F. AND ULLRICH O., 2003: Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: A link between demyelination and neuronal damage. *Journal of Experimental Medicine* 198, 1729-1740
- DIETSCHY J.M.** AND TURLEY S.D., 2001: Cholesterol metabolism in the brain. *Current Opinion in Lipidology* 12, 105-112
- DINARELLO C.A.**, 1998: Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 antagonist. *International Reviews of Immunology* 16, 457-499
- DREW P.D.** AND CHAVIS J.A., 2000: Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *Journal of Neuroimmunology* 111, 77-85
- DREW P.D.**, CHAVIS J.A. AND BHATT R., 2003: Sex steroid regulation of microglial cell activation. Relevance to multiple sclerosis. *Annals New York Academy of Science* 1007, 329-334
- DYER R.G.**, STEWART M.W., MITCHESON J., GEORGE K., ALBERTI M.M. AND LAKER M.F., 1997: 7-Ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clinica Chimica Acta* 260, 1-13
- DOBBIE M.S.**, HURST R.D., KLEIN N.J. AND SURTEES R.A.H., 1999: Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells by tumour necrosis factor- α in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Research* 830, 330-336
- DONG C.**, DAVIS R.J. AND FLAVELL R.A., 2002: MAP kinases in the immune response. *Annual Review of Immunology* 20, 55-72
- DUGAN L.L.**, SENSI S.L., CANZONIERO L.M.T., HANDRAN S.D., ROTHMAN S.M., LIN T.-S., GOLDBERG M.P. AND CHOI D.W., 1995: Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *Journal of Neuroscience* 15, 6377-6388
- DUNCAN I.D.**, 1996: Glial cell transplantation and remyelination of the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 22, 87-100
- ECKERT R.L.**, BROOME A.-M., RUSE M., ROBINSON N., RYAN D. AND LEE K., 2004: S100 proteins in the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 123, 23-33
- ELIASSON M.J.**, SAMPEI K., MANDIR A.S., HURN P.D., TRAYSTMAN R.J., BAO J., PIEPER A., WANG Z., DAWSON T.M., SNYDER S.H. AND DAWSON V.L., 1997: Poly(ADP-ribose)polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Medicine* 3, 1089-1095
- ELICES M.J.**, 2002: BX-471 Berlex. *Current Opinion Investigational Drugs* 3, 865-869
- EL KHOURY J.**, HICKMAN S.E., THOMAS C.A., LOIKE J.D. AND SILVERSTEIN S.C., 1998: Microglia scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 19: 81-84
- EMIG S.**, SCHMALZ D., SHAKIBAEI M. AND BUCHNER K., 1995: The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope. *Journal of Biological Chemistry* 270, 13787-13793

ETO M., YOSHIKAWA H., FUJIMURA H., NABA I., SUMI-AKAMARU H., TAKAYASU S., ITABE H. AND SAKODA S., 2003: The role of CD36 in peripheral nerve remyelination after crush injury. *European Journal of Neuroscience* 17, 2659-2666

EVANGELOU N., JACKSON M., BEESON D. AND PALACE J., 1999: Association of the APOE e4 allele with disease activity in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 67, 203-205

FASSAS A., PASSWEG J.R., ANAGNOSTOPOULOS A., KAZIS A., KOZAK T., HAVRDOVA E., CARRERAS E., GRAUS F., KASHYAP A., OPENSHAW H., SCHIPPERUS M., DECONINCK E., MANCARDI G., MARMONT A., HANSZ J., RABUSIN M., ZUAZU NAGORE F.J., BESALDUCH J., DENTAMARO T., FOUILLARD L., HERTENSTEIN B., LA NASA G., MUSSO M., PAPINESCHI F., ROWE J.M., SACCARDI R., STECK A., KAPPOS L., GRATWOHL A., TYNDALL A., SAMIJN J.; AUTOIMMUNE DISEASE WORKING PARTY OF THE EBMT (EUROPEAN GROUP FOR BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION), 2002: Haematopoietic stem cell transplantation for multiples sclerosis. A retrospective multicenter study. *Journal of Neurology* 249, 1088-1097

FEBBRAIO M., PODREZ E.A., SMITH J.D., HAJJAR D.P., HAZEN S.L., HOFF H.F., SHARMA K. AND SILVERSTEIN R.L., 2000: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against arteriosclerosis lesion development in mice. *Journal of Clinical Investigation* 105, 1049-1056

FIFE B.T., HUFFNAGLE G.B., KUZIEL W.A. AND KARPUS W.J., 2000: CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* 192, 899-905

FLÜGEL A., SCHWAIGER F.W., NEUMANN H., MEDANA I., WILLEM M., WEKERLE H, KREUTZBERG G.W. AND GRAEBER M.B., 2000: Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathology* 10, 353-364

FRANZEN R., BOUHY D. AND SCHOENEN J., 2004: Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine 'granulocyte-macrophage colony stimulating factor'. *Neuroscience Letter* 361, 76-78

FROTSCHER M. ZAFIROV S. AND HEIMRICH B., 1995: Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Progress in Neurobiology* 45, 143-164

FUBINI B. AND HUBBARD A., 2003: Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 1507-1516

GALEA E., HENEKA M.T., DELLO RUSSO C. AND FEINSTEIN D.L., 2003: Intrinsic regulation of brain inflammatory responses. *Cell Molecular Neurobiology* 23, 625-635

GEBICKE-HAERTER P.J., VAN CALKER D., NÖRENBERG W. AND ILLES P., 1996: Molecular mechanisms of microglial activation. Implications for regenerative and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*. 29, 1-12

GEHRMANN J., MATSUMOTO X. AND KREUTZBERG G.W., 1995: Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Research Review* 20, 269-287

GENAIN C.P., CANNELLA B., HAUSER S.L. AND RAINE C.S., 1999: Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Medicine* 5, 170-175

GENG Y.-J. AND LIBBY P., 2002: Progression of atheroma: A struggle between death and procreation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 22, 1370-1380

GIASSON B.I., ISCHIPOPOULOS H., LEE V. M.-Y. AND TROJANOWSKI J.Q., 2002: The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1264-1275

GIUBILEI F., ANTONINI G. DI, LEGGE S., SORMANI M.P., PANTANO P., ANTONINI R., SEPE-MONTI M., CARAMIA F. AND POZZILLI C., 2002: Blood cholesterol and MRI activity in first clinical episodi suggestive of multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 106, 109-112

GILGUN-SHERKI Y., MELAMED E. AND OFFEN D., 2004: The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. *Journal of Neurology* 251, 261-268

GIOVANNONI G., HEALES S.J.R., LAND J.M. AND THOMPSON E.J. 1998: The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 4, 212-216

GOLDSTEIN J.L. AND BROWN M.S., 1990: Regulation of mevalonate pathway. *Nature* 343, 425-430

GORDON S., 1995: The macrophage. *Bioassays* 17, 977-986

GOTO S., XUE R., SUGO N., SAWADA M., BLIZZARD K.K., POITRAS M.F., JOHNS D.C., DAWSON T.M., DAWSON V.L., CRAIN B.J., TRAYSTMAN R.J., MORI S. AND HURN P.D., 2002: Poly(ADP-ribose) polymerase impairs early and long-term experimental stroke recovery. *Stroke* 33, 1101-1106

GRAHAM A., HOGG N., KALYANARAMAN B., O'LEARY V., DARLEY-USMAR V. AND MONCADA S., 1993: Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* 330, 181-185

GRANUCCI F., PETRALIA F., URBANO M., CITTERIO S., DI TOTA F., SANTAMBROGIO L. AND RICCIARDI-CASTAGNOLI P., 2003: The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood* 102, 2940-2947

GREEN L. C., WAGNER D.A., GLOGOWSKI J., SKIPPER P. L., WISHNOK J. S. AND TANNENBAUM S. R., 1982: Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126, 131-138

GRIESENBECK J., OEI S.L., MAYER-KUCKUK P., ZIEGLER M., BUCHLOW G. AND SCHWEIGER M., 1997: Protein-protein interaction of the human poly(ADP-ribose)transferase depends on the functional state of the enzyme. *Biochemistry* 36, 7297-7304

GROLLEAU A., MISEK D.E., KUICK R., HANASH S. AND MULE J.J., 2003: Inducible expression of macrophage receptor MARCO by dendritic cells following phagocytic uptake of dead cells uncovered by oligonucleotide arrays. *Journal of Immunology* 171, 2879-2888

HA H.C., HESTER L.D. AND SNYDER S.H., 2002: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99, 3270-3275

- HA H.C.** AND SNYDER S.H., 2000: Poly(ADP-ribose)polymerase in the nervous system. *Neurobiology of Disease* 7, 225-239
- HAGEMANN C.** AND BLANK J.L., 2001: The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cellular Signalling* 13, 863-875
- HAILER N.P.**, JÄRHULT J.D. AND NITSCH R., 1996: Resting microglia cells in vitro: Analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice culture. *Glia* 18, 319-331
- HALLIWELL B.**, 2002: Hypothesis: Proteasomal Dysfunction. A primary event in neurodegeneration that leads to nitritative and oxidative stress and subsequent cell death. *Annals of New York Academy of Science* 962, 182-194
- HAMILTON J.A.**, JESSUP W., BROWN A.J. AND WHITTY G., 2001: Enhancement of macrophage survival and DNA synthesis by oxidized-low-density-lipoprotein (LDL)-derived lipids and by aggregates of lightly oxidized LDL. *Biochemical Journal* 355, 207-214
- HAN J.**, HAJJAR D.P., TAURAS J.M. AND NICHOLSON A.C., 1999: Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *Journal of Lipid Research* 40, 830-838
- HANISCH U.K.** 2001, Microglia as a source and target of cytokine activities in the brain. In STREIT W.J, editor. *Microglia in the degenerating and regenerating CNS*. New York: Springer Verlag 79-124
- HANISCH U.-K.**, 2002: Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140-155
- HANSSON E.** AND RÖNNBÄCK, 2003: Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB Journal* 17, 341-348
- HARTUNG H.P.** AND RIECKMANN P., 1997: Pathogenesis of immune-mediated demyelination in the CNS. *Journal of Neural Transmission*. 50, 173-181
- HASSA P.O.**, COVIC M., HASAN S., IMHOF R. AND HOTTIGER M.O., 2001: The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF- κ B Coactivator function. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 45588-45597
- HASSA P.O.** AND HOTTIGER M.O., 2002: The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase-1 as novel coactivator of NF- κ B in inflammatory disorders. *Cellular and Molecular Life Science* 59, 1534-1553
- HATZELMANN A.** AND SCHUDT C., 2001: Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*. 297, 267-279
- HAYASHI H.**, CAMPENOT R.B., VANCE D.E. AND VANCE J.E., 2004: Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *Journal of Biological Chemistry* 279, 14009-14015
- HAYDEN J.M.**, BRACHOVA L., HIGGINS K., OBERMILLER L., SEVANIAN A., KHANDRIKA S. AND REAVEN D., 2002: Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *Journal of Lipid Research* 43, 26-35

- HEMMER B.**, ARCHELOS J.J. AND HARTUNG H.-P., 2002: New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 291-301
- HEMMER K.**, FRANZEN L., VANDERSTICHELE H. VANMECHELEN E. AND HEUSCHLING P., 2001: An *in vitro* model for the study of microglia-induced neurodegeneration: involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- α . *Neurochemistry International* 38, 557-565
- HEPPNER F.L.**, SKUTELLA T. HAILER N.P., HAAS D. AND NITSCH R., 1998: activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *European Journal of Neuroscience* 10, 3284-3290
- HICKEY W.F.**, 1999: Leucocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Seminars in Immunology* 11, 125-137
- HICKEY W.F.**, 2001: Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36, 118-124
- HISAHARA S.**, OKANO H. AND MIURA M., 2003: Caspase-mediated oligodendrocyte cell death in the pathogenesis of autoimmune demyelination. *Neuroscience Research* 46, 387- 397
- HOHLFELD R.**, LONDEI M., MASSACESI L. AND SALVETTI M., 1995: T-cell autoimmunity in multiple sclerosis. *Immunology Today* 16, 259-261
- HOLTZMAN D.M.** AND FAGAN A.M., 1998: Potential role of apoE in structural plasticity in the nervous system: Implications for disorders of the central nervous system. *Trends in Cardiovascular Medicine* 8, 250-255
- HOPKINS S.J.** AND ROTHWELL N.J., 1995: Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in Neuroscience* 18, 83-88
- HU B.R.**, LIU C.L. AND PARK D.J., 2000: Alteration of MAP kinase pathways after transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood and Flow Metabolism* 20, 1089-1095
- HUANG D.**, HAN Y., RANI M.R.S., GLABINSKI A., TREBST C., SORENSEN T., TANI M., WANG J., CHIEN P., O'BRYAN S., BIELECKI B., ZHOU Z.L., MAMUMDER S. AND RANSOHOFF R.M., 2000: Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. *Immunological Reviews* 177, 52-67
- IDE N.** AND LAU B.H., 1997: Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49, 908-911
- IRVING E.A.**, RAY A.M., STATON P.C., DAVIS R.P., HADINGHAM S.J., CAMPBELL C.A., ROBERTS J., REITH A.D., HUNTER A.J. AND PARSON A.A., 2001: Neuroprotection with the MEK inhibitor U0126 following ischemic injury. *Journal of Cerebral Blood and Flow Metabolism* 21, 379-
- IRVING E.A.** AND BAMFORD M., 2002: Role of mitogen- and stress-activated kinase in Ischemic Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 22, 631-647
- ISCHIROPOULOS H.** AND BECKMAN J.S., 2003: Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect or association? *Journal of Clinical Investigation* 111, 163-169
- JACOBSON M.K.** AND JACOBSON E.L., 1999: Discovering new ADP-ribose polymer cycles: Protecting the genome and more. *Trends in Biochemistry Science* 24, 415-417

- JENNER P.**, 2003: Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 53, 26-38
- JI R.-R.**, KOHNO T., MOORE K.A. AND WOOLF C.J., 2003: Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neuroscience* 26, 696-706
- JOHANNESSEN M.**, DELGHANDI M.P. AND MOENS U., 2004: What turns CREB on? *Cellular Signalling* 16, 1211-1227
- JOHNSON G.L.** AND LAPADAT R., 2002: Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinase. *Science* 298, 1911-1912
- JOO J.H.**, KIM J.W., LEE Y., YOON S.A., KIM J.H., PAIK S.G. AND CHOE I.S., 2003: Involvement of NF-kappaB in the regulation of S100A6 gene expression in human hepatoblastoma cell line HepG2. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*. 307, 274-280
- JUREVICS H.** AND MORELL P., 1995: Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *Journal of Neurochemistry* 64, 895-901
- KALYVAS A.** AND DAVID S., 2004: Cytosolic phospholipase A₂ plays a key role in the pathogenesis of multiples sclerosis-like disease. *Neuron* 41, 323-335
- KARIN M.** AND BEN-NERIAH Y., 2000: Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-kB activity. *Annual Review of Immunology* 18, 621-663
- KARPUS W.J.** AND RANSOHOFF R.M., 1998: Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: Temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. *Journal of Immunology* 161, 2667-2671
- KELLER J.N.**, HANNI K.B. AND KINDY M.S., 2000: Oxidized high-density lipoprotein induces neuron death. *Experimental Neurology* 164, 621-630
- KELLER J.N.**, HANNI K.H. AND MARKESBERY W.R., 1999: 4-Hydroxynonenal increases neuronal susceptibility to oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research* 58, 823-830
- KERSCHENSTEINER M.**, STADELMAN C., DECHANT G., WEKERLE H. AND HOHLFELD R., 2003: Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune system: implications for neurologic disease. *Annals of Neurology* 53, 292-304
- KIVATINITZ S.C.**, PELSMAN M.A., ALONSO A.DEL C., BAGATOLLI L. AND QUIROÁ, 1997: High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells. *Journal of Neurochemistry* 69, 2102-2114
- KNUDSEN S.**, 2004: Analysis of DNA micorarray data. John Wiley & Sons, Inc. second edition
- KOISTINAHO M.** AND KOISTINAHO J., 2002: Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia* 40, 175-183
- KÖLSCH H.**, LÜTJOHANN D., TULKE A., BJÖRKHEM I. AND RAO M.L., 1999: The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Research* 818, 171-175
- KORNEK B.** AND LASSAMANN H., 1999: Axonal pathology in multiple sclerosis: A historical note. *Brain Pathology* 9, 651-656

KORNEK B., STORCH M.K., WEISSERT R., WALLSTROEM E., STEFFERL A., OLSSON T., LININGTON C., SCHMIDBAUER M. AND 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* 157, 267-276

KOUTSILIERI E., SCHELLER C., TRIBL F. AND RIEDERER P., 2002: Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress- microglial contribution. *Parkinsonism and Related Disorders* 8, 401-406

KREMENCHUTZKY M., COTTRELL D., RICE G., HADER W., BASKERVILLE J., KOOPMAN W. AND EBERS G.C., 1999: The natural history of multiple sclerosis: A geographically based study. 7. Progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: A re-evaluation. *Brain* 122, 1941-1950

KREUZBERG G.W., 1996: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neuroscience* 19, 312-318

KRITHARIDES L., JESSUP W., GIFFORD J. AND DEAN R. T., 1993: A method for defining the stages of low-density lipoprotein oxidation by the separation of cholesterol- and cholesteryl ester-oxidation products using HPLC. *Analytical Biochemistry* 213, 79-89

KUCHROO V.K., SOBEL R.A., LANING J.C., MARTIN C.A., GREENFIELD E., DORF M.E. AND LEES M.B., 1992: Experimental allergic encephalomyelitis mediated by cloned t cells specific for a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. *The Journal of Immunology* 148, 3776-3782

KWAK B., MULHAUPT F., MYIT S. AND MACH F.: Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nature Medicine* 6, 1399-1402

KYOSSEVA S.V., 2004: Mitogen-activated protein kinase signaling. *International Review of Neurobiology* 59, 201-220

LA FLAMME A.C., RUDDENKLAU K. AND BÄCKSTRÖM T., 2003 : Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infection and Immunity* 71, 4996-5004

LÄMMLI U.K., 1970: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

LASSMANN H., RAINE C.S., ANTEL J. AND PRINEAS J.W., 1998: Immunopathology of multiplesclerosis: Report on an international meeting held at the Institut of Neurology of the University of Vienna. *Journal of Neuroimmunology* 86, 213-217

LAURENZI M. A., ARCURI C., RUGGERO R., MARCONI P. AND BOCCHINI V., 2002: Effects of microenvironment on morphology and function of microglial cell line BV-2. *Neurochemical Research* 26, 1209-1216

LAWSON L.J., PERRY V.H., DRI P. AND GORDON S., 1991: Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170

LE PAGE C., SANCEAU J., DRAPIER J.C. AND WIETZERBIN J., 1998 : Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF- κ B activation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 243, 451-457

LEONI V., MASTERMAN T., MOUSAVI F.S., WRETLIND B., WAHLUND L.O., DICZFALUSY U., HILLERT J. AND BJÖRKHELM I., 2004: Diagnostic use of cerebral and extracerebral oxysterols. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 42, 186-191

LIANG M., MALLARI C., ROSSER M., NG H.P., MAY K., MONAHAN S., BAUMAN J.G., ISLAM I., GHANNAM A., BUCKMAN B., SHAW K., WEI G.P., XU W., ZHAO Z., HO E., SHEN J., OANH H., SUBRAMAYAM B., VERGONA R., TAUB D., DUNNING L., HARVEY S., SNIDER R.M., HESSELGESSER J., MORRISSEY M.M. AND PEREZ H.D., 2000: Identification and characterization of a potent, selective, and orally active antagonist of the CC chemokine receptor-1. *Journal of Biological Chemistry* 275, 19000-19008

LI H., CUZNER M.L. AND NEWCOMBE J., 1996: Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques. *Neuropathology Applied in Neurobiology* 22, 207-215

LINDL T., 2002: *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin 5. Auflage

LING E.A. AND WONG W.C., 1993: The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7, 9-18

LIU B., GAO H.-M., WANG J.-Y., JEOHN G.-H., COOPER C.L. AND HONG J.-S., 2002: Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Science* 962, 318-331

LIU D., LING X., WEN J. AND LIU J., 2000: The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrated proteins. *Journal of Neurochemistry* 75, 2144-2154

LIZARD G., MOISANT M., CORDELET C., MONIER S., GAMBERT P. AND LAGROST L., 1997 : Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. *Journal of Pathology* 183, 330-338

LOCK C.B. AND HELLER R.A., 2003: Gene microarray analysis of multiple sclerosis lesions. *Trends in Molecular Medicine* 9, 535-541

LOCKART B.P., CRESSEY K.C. AND LEPAGNOL J.M., 1998: Suppression of nitric oxide formation by tyrosine kinase inhibitors in murine N9 microglia. *British Journal of Pharmacology* 123, 879-889

LOMBARDI G., MIGLIO G, CANONICO P.L., NALDI P., COMI C. AND MANACO F., 2003: Abnormal response to glutamate of T lymphocytes from multiple sclerosis patients. *Neuroscience Letters* 340, 5-8

LUCCHINETTI C., BRUCK W., PARISI J., SCHEITHAUER B., RODRIGUEZ M. AND LASSMANN H., 1999: A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions: A study of 113 cases. *Brain* 122, 2279-2295

MACK C.L., VANDERLUGT-CASTANEDA C.L., NEVILLE K.L. AND MILLER S.D., 2003: Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 144, 68-79

MAHER P. AND DAVIS J. B., 1996: The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *Journal of Neuroscience* 16, 6394-6401

- MAOR I.**, KAPLAN M., HAYEK T., VAYA J., HOFFMAN A. AND AVIRAM M., 2000: Oxidized monocyte-derived macrophages in aortic atherosclerotic lesion from apolipoprotein E-deficient mice and from human carotid artery contain lipid peroxides and oxysterols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 775-780
- MARTIN J.H.**, MOHIT A.A. AND MILLER C.A., 1996: Developmental expression in the mouse nervous system of p49^{3F12} SAP kinase. *Molecular Brain Research* 35, 47-57
- MARTIN R.**, MCFARLAND H.F. AND MCFARLIN D.E., 1992: Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annuals Reviews* 10, 153-187
- MATTSON M.P.**, 2004: Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signalling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Science* 1012, 37-50
- MATTSON M.P.** AND CAMANDOLA S., 2001: NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal of Clinical Investigation* 107, 247-254
- MAYER-KUCKUK P.**, ULLRICH O., ZIEGLER M., GRUNE T. AND SCHWEIGER M., 1999: Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasom *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259, 576-581g
- MCGEER P.L.** AND MCGEER E.G., 2001: Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging* 22, 799-809
- MCLACHLAN J.L.**, SLOAN A.J., SMITH A.J., LANDINI G. AND COOPER P.R., 2004: S100 and cytokine expression in caries. *Infection and Immunity* 72, 4102-4108
- MICHIKAWA M.**, 2003: Cholesterol paradox: Is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease? *Journal of Neuroscience Research* 72, 141-146
- MIGUET-ALFONSI C.**, PRUNET C., MONIER S., BESSEDE G., LEMAIRE-EWING S., BERTHIER A., MENETIER F., NEEL D. GAMBERT P. AND LIZARD G., 2002: Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7-beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Comparison with various pro-apoptotic chemical. *Biochemical Pharmacology* 64, 527-541
- MIKKELSEN R.B.** AND WARDMAN P., 2003: Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734-5754
- MINAGAR A.**, SHAPSHAK P. FUJIMURA R., OWNBY R., HEYES M. AND EISDORFER C., 2002: The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *Journal of Neurological Science* 15, 13-23
- MIYAJIMA H.**, ADACHI J., KOHNO S., TAKAHASHI Y., UENO Y. AND NAITO T., 2001: Increased oxysterols associated with iron accumulation in the brains and visceral organs of aceruloplasminemia patients. *Oxford Journal of Medicine* 94, 417-422
- MOORE K.J.**, EL KHOURY J., MEDEIROS L.A., TERADA K., GEULA C., LUSTER A.D. AND FREEMAN M.W., 2002: A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of β -amyloid. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 47373-47379

- MOREIRA E.F.**, JAWORSKI C., LI A. AND RODRIGUEZ I.R., 2001: Molecular and biochemical characterization of a novel oxysterol-binding Protein (OSBP2) highly expressed in retina. *Journal of Biological Chemistry* 276, 18570-18578
- MORO M.A.**, CÁRDENAS A., HURTADO O., LEZA J.C. AND LIZASOAIN I., 2004: Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 36, 265-275
- MOSMANN T.** 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63
- MUIRAS M.L.** AND BÜRKLE A., 2000: Defending genome integrity over life span: A proposed role for PARP-1. *Experimental Gerontology* 35, 703-709
- MURPHY T. H.**, MIYAMOTO M., SASTRE A., SCHNAAR R. L., AND COYLE J. T., 1989: Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2, 1547-1558
- MURPHY S.**, SIMMONS M.L., AGULLO L, GARCIA A., FEINSTEIN D.L., GALEA E., REIS D.J., MINC-GOLOMB D. AND SCHWARTZ J.P., 1993: Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends in Neuroscience* 16, 323-328
- MURUGESAN G.**, CHISOLM G.M. AND FOX P.L., 1993: Oxidized low density lipoprotein inhibits the migration of aortic endothelial cells in vitro. *Journal of Cell Biology* 120, 1011-1019
- NAMURA S.**, IIHARA K., TAKAMI S., NAGATA I., KIKUCHI H., MATSUSHITA K., MOSKOWITZ M.A., BONVENTRE J.V. AND ALESSANDRINI A., 2001: Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 98, 11569-11574
- NAU R.** AND BRUCK W., 2002: Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends in Neuroscience* 25, 38-45
- NESSLER S.**, DODEL R., BITTNER A., REUSS S., DU Y., HEMMER B. AND SOMMER N., 2002: Effect of minocycline in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology* 52, 689-690
- NEUMANN H.**, 2001: Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36, 191-199
- NEWELL D.W.**, BARTH A., PAPERMASTER V. AND MALOUF A.T., 1995: Glutamate and non-glutamate receptor mediated toxicity caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Journal of Neuroscience*, 15, 7702-7711
- NGUYEN V.T.** AND BENVENISTE E.N., 2002: Critical role of TNF- α and NF- κ B in IFN- γ -induced CD40 expression in microglia / macrophage. *Journal of Biological Chemistry* 277, 13796-13803
- NIRODI C.**, NAGDAS S., GYGI S.P., OLSON G., RUEDI A. AND RICHMOND A., 2001: A role for poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 276, 9366-9374
- NOSEWORTHY J.H.**, LUCCHINETTI C., RODRIGUEZ M. AND WEINSHENKER B.G., 2000: Multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 343, 938-952

NOSEWORTHY J., 2002: Multiple sclerosis: General clinical information. Benzon symposia 49, Copenhagen August 18-22: Multiple Sclerosis: Genetics, Pathogenesis and Therapy

O'CONNER K.C., BAR-OR A. AND HAFNER D.A., 2001: The neuroimmunology of multiple sclerosis: Possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *Journal of Clinical Immunology* 21, 81-92

OLIVER F.J., MENISSIER-DE MURCIA J., NACCI C., DECKER P., ANDRIANTSITOHAINA R., MULLER S., DE LA RUBIA G., STOCLET J.C. AND DE MURCIA G., 1999: Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- κ B activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO Journal* 18, 4446-4454

OLSSON T., KELIC S., EDLUND C., BKHIET M., HOJEBOERG B., VAN DER MEIDE P.H., LJUNGDAHL A. AND KRISTENSSON K., 1994: Neuronal interferon-gamma immunoreactive molecule: bioactivities and purification. *European Journal of Immunology* 24, 308-314

ONG W.Y., GOH E.W., LU X.R., FAROOQUI A.A., PATEL S.C. AND HALLIWELL B., 2003: Increase in cholesterol and cholesterol oxidation products, and role of cholesterol oxidation products in kainite-induced neuronal injury. *Brain Pathology* 13, 250-262

PARK S.-H., HUH S.-H., KIM M.-S., LEE S.H. AND CHOI E.-J., 2000: Nitric oxide negatively regulates cJun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 97, 14382-14387

PARKINSON J.F., MITROVIC B. AND MERRILL J.E., 1997: The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Journal of Molecular Medicine* 75, 174-186

PASHENKOV M., TELESHOVA N. AND LINK H., 2003: Inflammation in the central nervous system: The role for dendritic cells. *Brain Pathology* 12, 23-33

PATERSON P.Y., 1960: Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *Journal of Experimental Medicine* 111, 119-135

PEDOTTI R., DE VOSS J.J., STEINMAN L. AND GALLI S.J., 2003: Involvement of both, 'allergic' and 'autoimmune' mechanisms in EAE, MS and other autoimmune diseases. *Trends in Immunology* 24, 479-484

PERRELLA M.A., PELLACANI A., WIESEL P., CHIN M.T., FOSTER L.C., IBANEZ M., HSIEH C.-M., REEVES R., YET S.-F. AND LEE M.-E., 1999: High mobility group -I(Y) protein facilitates nuclear factor - κ B binding and transactivation of the inducible nitric-oxide synthase promoter/enhancer. *Journal of Biological Chemistry* 274, 9045-9052

PETERSON J.W., BÖ L., MÖRK S., CHANG A. AND TRAPP B.D., 2001: Transected neurites, apoptotic neurons and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology* 50, 389-400

PHIEL F. AND LIDMAN O., 2001: Neuroinflammation in the rats – CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. *Immunological Reviews* 184, 212-225

POCOCK J.M. AND LIDDLE A.C., 2001: Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease. *Progress in Brain Research* 132, 555-565

- POPOVIC N.**, SCHUBAR A., GOETZ B.D., ZHANG S.C., LININGTON C. AND DUNCAN I.D., 2002: Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by tetracycline. *Annals of Neurology* 51, 215-223
- POSSE DE CHAVIS E.I.**, VANCE D.E., CAMPENOT R.B., KISS R.S. AND VANCE J.E., 2000 : Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *Journal of Biological Chemistry* 275, 19883-19890
- PRITCHARD J.**, HUGHES R.A.C., REES J.H., WILLSON H.J. AND NICOLL J.A.R., 2003: Apolipoprotein E genotypes and clinical outcome in Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 74, 971-973
- QIN Y.**, DUQUETTE P., ZHANG Y., TALBOT P., POOLE R. AND ANTEL J., 1998: Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiples sclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 102, 1045-1050
- RAINE C.S.**, 1984 : Analysis of autoimmune demyelination : Its impact upon multiple sclerosis. *Laboratory Investigation* 50, 608-635
- RAINE C.S.**, 1994 : The Dale e. McRarlin Memorial Lecture: The immunology of the multiple sclerosis lesion. *Annals of Neurology* 36, 61-72
- RAINE C.S.**, 1997 : Demyelinationg diseases. In *Textbook of Neuropathology* (Third Edition). DAVIS R.L. AND ROBERTSON D.M. editors. Willams and Wilkins Baltimore. 243-286
- RAINE C.S.**, 1997: The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte as the target in multiples sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 77, 135-152
- RAINGEAUD J.**, GUPTA S., ROGERS J.S., DICKENS M., HAN J., ULEVITCH R.J. AND DAVIS R.J., 1995: Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *Journal of Biological Chemistry* 270, 7420-7426
- RAIVICH G.**, BOHATSCHKE M., KLOSS C.U., WERNER A., JONES L.L. AND KREUZBERG G.W., 1999: Neurological activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research Review* 30, 77-105
- RANSOHOFF R.** AND TANI M., 1998: Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends in Neuroscience* 21, 154-159
- RAO P.** AND SEGAL B.M., 2004: Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods in Molecular Medicine*. 102, 363-376
- REHM H.**, 2002: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin, 4. Auflage
- REINHECKEL T.**, ULLRICH O., SITTE N. AND GRUNE T., 2000: Differential impairment of 20S and 26S Proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 377, 65-68
- RIDGWAY N.D.**, DAWSON P.A., HO Y.K., BROWN M.S. AND GOLDSTEIN J.L., 1992: Translocation of oxysterol binding protein to golgi apparatus triggered by ligand binding. *Journal of Cell Biology* 116, 307-319

RINCÓN M., FLAVELL R.A. AND DAVIS R.A., 2000: The JNK and p38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune response. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 1328-1337

RIVERS T.M., SPRUNT D.H. AND GERRY B.P., 1933: Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *Journal of Experimental Medicine* 58, 39-53

RUDOLPH J.G., LEMASTERS J.J. AND CREWS F.T., 2000: Effects of NMDA and ferrous sulphate on oxidation and cell death in primary neuronal cultures. *Neurochemistry International* 37, 497-507

RUIZ P.J., GARREN H., RUIZ I., HIRSCHBERG, NGUYEN L.-V. T., KARPUJ M.V., COOPER M.T., MITCHELL D.J., FATHMAN C.G. AND STEINMAN L., 1999: Suppressive immunization with DNA encoding a self-peptide prevents autoimmune disease: Modulation of T cell costimulation. *Journal of Immunology* 162, 3336-3341

SATOH T., NAKATSUKA D., WATANABE Y., NAGAT I., KIKUCHI H. AND NAMAURA S., 2000: Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultures cortical neurons. *Neuroscience Letters* 288, 163-166

SAUCIER S.E., KANDUTSCH A.A., GAYEN A.K., SWAHN D.K. AND SPENCER T.A., 1989: Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. *Journal of Biological Chemistry* 264, 6863-6869

SCHIPPER H.M., CISSE S. AND STOPA E.G., 1995: Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Annals of Neurology* 37, 421-425

SCHMIDT K.N., LEUNG B., KWON M., ZAREMBER K.A., SATYAL S., NAVAS T.A., WANG F. AND GODOWSKI P.J., 2004: APC-Independent activation of NK cells by the toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *Journal of Immunology* 172, 138-143

SCHONHOFF C.M., BULSECO D.A., BRANCHO D.M., PARADA L.F. AND ROSS A.H., 2001: The Ras-ERK pathway is required for the induction of neuronal nitric oxide synthase in differentiating PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 78, 631-639

SCHROEPFER G.J., 2000: Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews* 80, 361-554

SCHOLDING N., 2001: The differential diagnosis of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 5, 147-160

SCOTT G.S., VIRAG L., SZABO C. AND HOOPER D.C., 2003: Peroxynitrite-induced oligodendrocyte toxicity is not dependent on poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Glia* 41, 105-106

SCOTT G.S., KEAN R.B., MIKHEEVA T., FABIS M.J., MABLEY J.G., SZABO C. AND HOOPER D.C., 2004: The therapeutic effects of PJ34, a selective inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, in experimental allergic encephalomyelitis are associated with immunomodulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 310, 1053-1061

SENGPIEL B., PREIS E., KRIEGLSTEIN J. AND PREHN J.H.M., 1998: NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria. *European Journal of Neuroscience* 10, 1903

- SEVANIAN A.**, SERGLIA R., TRALDI P., ROSSATO P., URINI F. AND HODIS H., 1994: Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas- and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine* 17, 397-409
- SHAFFER L. L.**, MCNULTY J. A. AND YOUNG M. R. I., 2002: Brain activation of monocyte-lineage cells: Involvement of interleukin-6. *NeuroImmunoModulation* 10, 295-304
- SHAREEF S.**, SAWADA A. AND NEUFELD A.H., 1999: Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 40, 2884-2891
- SHIEH W.M.**, AME J.C., WILSON M.V., WANG Z.Q., KOH D.W., JACOBSON M.K. AND JACOBSON E.L., 1998: Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30069-30072
- SHIN T.**, AHN M., JUNG K., HEO S., KIM D., JEE Y., LIM Y.K. AND YEO E.J., 2003: Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 140, 118-125
- SHORE V.G.**, SMITH M.E., PERRET V. AND LASKARIS M.A., 1987: Alterations in plasma lipoproteins and apolipoproteins in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Lipid Research* 28, 119-129
- SILVERSTEIN R.L.** AND FEBBRAIO M., 2000: CD36 and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 11, 483-491
- SIMPSON J.E.**, NEWCOMBE J., CUZNER M.L. AND WOODROOFE M.N., 1998: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroimmunology* 84, 238-249
- SMITH K.J.**, KAPOOR R. AND FELTS P.A., 1999: Demyelination: The role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathology* 9, 62-92
- SMITH K.J.** AND LASSMANN H., 2002: The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 1, 232-241
- SMITH M.E.**, 2001: Phagocytic properties of microglia in vitro: Implications for a role in multiple sclerosis and EAE. *Microscopy Research and Technique* 54, 81-94
- SMITH P. K.**, KROHN R. I., HERMANSON G.T., MALLIA A. K., GARTNER F. H., PROVENZANO M. D., FUJIMOTO E. K., GOEKE N. M., OLSON B. J. AND KLENK D. C., 1985: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85
- SMITH S.**, 2001: THE World according to PARP. *Trends in Biochemistry Science* 26, 174-179
- STANCIU M.** WANG Y., KENTO R., BURKE N., WATKINS S, KRESS G., REYNOLDS I., KLANN E., ANGIOLIERI M. R., JOHNSON J. W. AND DEFRANCO D. B 2000: Persistent Activation of ERK Contributes to Glutamate-induced Oxidative Toxicity in a Neuronal Cell Line and Primary Cortical Neuron Cultures. *Journal of Biological Chemistry* 275, 12200-12206
- STREIT W.J.**, HURLEY S.D., MCGRAW T.S., AND SEMPLE-ROWLAND S.L., 2000: Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukine-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *Journal of Neuroscience Research* 61, 10-20

- STRLE K.**, ZHOU J.H., SHEN W.H., BROUSSARD S.R., JOHNSON R.W., FREUND G.G., DANTZER R. AND KELLEY K.W., 2001: Interleukin-10 in the brain. *Critical Review in Immunology* 21, 427-449
- STUART G.** AND KRIKORIAN K.S., 1928: The neuro-paralytic accident of anti-rabies treatment. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 22, 327-377
- SUGINO T.**, NAZAKI K., TAKAGI Y., HATTORI I., HASHIMOTO N., MORIGUCHI T. AND NISHIDA E., 2000: Activation of mitogen-activated protein kinases after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *Journal of Neuroscience* 20, 4506-4514
- SWEATT J.D.**, 2001: The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry* 76, 1-10
- SZABO C.**, 2003: Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters* 140-141, 105-112
- SZEDLACSEK S.E.**, WASOWICZ E., HUELA S.A., NISHIDA H.I., KUMMEROW F.A. AND NISHIDA T., 1995: Esterification of oxysterols by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 270, 11812-11819
- TAN J.**, TOWN T., PARIS D., MORI T., SUO Z., CRAWFORD F., MATTSON M.P., FLAVELL R.A. AND MULLAN M., 1999: Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* 286, 2352-2355
- TEUNISSEN C.E.**, DIJKSTRA C.D., POLMAN C.H., HOOGERVORST E.L., VON BERGMANN K. AND LUTJOHANN D., 2003: Decreased levels of the brain specific 24S-hydroxycholesterol and cholesterol precursors in serum of multiple sclerosis patients. *Neuroscience Letters* 347, 159-162
- TEUNISSEN C.E.**, DIJKSTRA C.D., POLMAN C.H., 2005: Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 4, 32-41
- TEUTSCH S.M.**, BOOTH D.R., BENNETTS B.H., HEARD R.N.S. AND STEWART G.J., 2003: Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor- α gene and their association with multiple sclerosis. *European Journal of Human Genetics* 11, 509-515
- TOMPKINS S.M.** AND MILLER S.D., 2002: An array of possibilities for multiple sclerosis. *Nature Medicine* 8, 451-453
- TRAPP B.D.**, PETERSON J., RANSOHOFF R.M., RUDICK R., MÖRK S. AND BÖ L., 1998: Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 338, 278-285
- TSUJI M.**, INANAMI O. AND KUWABARA M., 2000: Neuroprotective effect of alpha-phenyl-tert-butyl nitrone in gerbil hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway and heat-shock proteins. *Neuroscience Letters* 282, 41-44
- TUOHY V.K.**, LU Z., SOBEL R.A., LAURSEN R.A. AND LEES M.B., 1988: A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 141, 1126-1130
- ULLRICH O.**, CIFTCI Ö AND HASS R., 2000: Proteasome activation by poly-ADP-ribose-polymerase in human myelomonocytic cells after oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 995-1004

- ULLRICH O.**, DIESTEL A., BECHMANN I., HOMBERG M., GRUNE T., HASS R. AND NITSCH R., 2001a: Turnover of oxidatively damaged nuclear proteins in BV-2 microglial cells is linked to their activation state by poly(ADP-ribose)polymerase. *The FASEB Journal* 15, 1460-1462
- ULLRICH O.**, DIESTEL A., EYÜPOGLU I.Y. AND NITSCH R., 2001b: Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Nature Cell Biology* 3, 1035-1042
- ULLRICH O.**, REINHECKEL T., SITTE N., HASS R., GRUNE T. AND DAVIES K.J.A., 1999: Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 96, 6223-6228
- ULLRICH O.**, SIEMS W.G., LEHMANN K., HUSER H., EHRLICH W. AND GRUNE T., 1996: Inhibition of poly(ADP-ribose) formation by 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Biochemical Journal* 315, 705-708
- ULLRICH O** UND ZIPP F., 2004: Multiples Sklerose: Neue Konzepte zur Immunopathogenese. *Pharmazeutische Zeitung* 37
- VAN DER VEEN R.C.** AND ROBERTS L.J., 1999: Contrasting role for nitric oxide and peroxynitrite in the peroxidation of myelin lipids. *Journal of Neuroimmunology* 95, 1-7
- VAZIRI N.D.**, LEE Y.-S., LIN C.-Y., LIN V.W. AND SINDHU R.K., 2004: NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury. *Brain Research* 995, 76-83
- VIRAG L.** AND SZABO C., 2001: Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB Journal* 15, 99-107
- VIVIANI B.**, BARTESAGHI S., CORSINI E., GALLI C.L. AND MARINOVICH M., 2004: Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicology Letters* 149, 85-89
- WAETZIG V.** AND HERDEGEN T., 2004: Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neuroscience Letters* 361, 64-67
- WANG M.-J.**, LIN W.-W., CHEN H.-L., CHANG Y.-H., OU H.-C., KUO J.-S., HONG J.-S. AND JENG K.-C.G., 2002: Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *European Journal of Neuroscience* 16, 2103-2112
- WANG T.**, QIN L., LIU B., LIU Y., WILSON B., ELING T.E., LANGENBACH R., TANIURA S. AND HONG J.-S., 2004: Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E₂ in microglia. *Journal of Neurochemistry* 88, 939-947
- WEKERLE H.**, KOJIMA K., LANNES-VIEIRA J., LASSMANN H. AND LININGTON C., 1994: Animal Models. *Annals of Neurology* 36, 47-53
- WIECHELMAN K.**, BRAUN R. AND FITZPATRICK J., 1988: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* 175, 231-237
- WILLENBORG D.O.** AND PROWSE S.J., 1983: Immunoglobulin-deficient rats fail to develop experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 5, 99-109

- WILLIAMSON R.A.**, BURGOON M.P., OWENS G.P., GHANSAI O., LECLERC E., FIRME L., CARLSON S., CORBOY J., PARREN P.W., SANNA P.P., GILDEN D.H. AND BURTON D.R., 2001: Anti-DNA antibodies are a major component of the intrathecal B cell response in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Science* 98, 1793-1798
- WOLF S.D.**, DITTEL B.N., HARDARDOTTIR F. AND JANEWAY C.A. JR, 1996: Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 184, 2271-2278
- WOODROOFE M.N.** AND CUZNER M.L., 1993: Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: detection by non-radioactive in situ hybridisation. *Cytokine* 5, 583-588
- WOO M. -S.**, JANG P.-G., PARK J.-S., KIM W. -K., JOH T. H. AND KIM H.-S., 2003: Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyryl-cAMP in BV-2 microglial cells. *Molecular Brain Research* 113; 86- 96
- WU D.-C.**, YE W., CHE X.-M., AND YANG G.-Y. 2000: Activation of mitogen activated protein kinase after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain. *Journal of Cerebral Blood and Flow Metabolism* 20, 1320-1330
- WURZER G.**, HERCEG Z. AND WESIERSKA-GADEK J., 2000: Increased resistance to anticancer therapy of mouse cell lacking the poly(ADP-ribose) polymerase attributable to up-regulation of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Cancer Research* 60, 4238-4244
- XIA Z.**, DICKENS M., RAINGEAUD J., DAVIS R.J. AND GREENBERG M.E., 1995: Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331
- XIE Z.**, SMITH C.J. AND VAN ELDIK L.J., 2004: Activated Glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. *Glia* 45, 170-179
- XU J.**, KIM G.-M., CHEN S., YAN P., AHMED H., KU G., BECKMAN J.S., XU M.X. AND HSU C.Y., 2001: iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 18, 523-532
- YESNER L.M.**, HUH H.Y., PEARCE S.F. AND SILVERSTEIN R.L., 1996: Regulation of monocyte CD36 and Thrombospondin-1 Expression by soluble mediators. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 16, 1019-1025
- YOUNG S.-H.**, DONG W.-J. AND JACOBS R. R., 2000: Observation of a partially opened triple-helix conformation in 1→3-β-glucan by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* 275, 11874-11879
- ZAHM J.-M.**, BACONNAIS S., MONIER S., BONNET N., BESSÉDE G., GAMBERT P., PUCHELLE E. AND LIZARD G., 2003: Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: Analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. *Cytometry, Part A* 52, 57-69
- ZAMVIL S.S.** AND STEINMANN L., 1990: The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annual Reviews* 8, 579-621
- ZANG J.**, AKWA Y., EL-ETR M., BAULIEU E.E. AND SJOVALL J., 1997: Metabolism of 27-, 25- and 24-hydroxycholesterol in rat glial cells and neurons. *Biochemistry* 322, 175-184

ZAPPULLA J.P., AROCK M., MARS L.T. AND LIBLAU R.S., 2002: Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *Journal of Neuroimmunology* 131, 5-20

ZHAO M., LIU Y., WANG X., NEW L., HAN J. AND BRUNK U.T., 2002: Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophage exposed to oxidized LDL. *Acta Pharmacologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 110, 458-468

ZHOU Q., WASOWICZ E., HANDLER B., FLEISCHER L. AND KUMMEROW F.A., 2000: An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 149, 191-197

ZHU X., LEE H.-G., RAINA A.K., PERRY G. AND SMITH M.A., 2002: The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11, 270-281

ZHU S., STAVROVSKAYA I.G., DROZDA M., KIM B.Y., ONA V., LI M., SARANG S., LIU A.S., HARTLEY D.M., WU DU C., GULLANS S., FERRANTE R.J., PRZEDBORSKI S., KRISTAL B.S. AND FRIEDLANDER R.M., 2002: Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74-78

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Oliver Ullrich, Stellvertretender Direktor am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, für die Bereitstellung des überaus interessanten Promotionsthemas, seine fachliche Unterstützung und Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Robert Nitsch, Direktor des Instituts für Anatomie, Abteilung Zell- und Neuroanatomie der Humboldt-Universität Berlin, Universitätsklinikum der Charité, danke ich für die Möglichkeit, die hier vorgelegten Untersuchungen in seiner Abteilung durchführen zu können.

Bei Dr. Cedric S. Raine (PhD, DSc) vom Albert Einstein College of Medicine in New York bedanke ich mich für die Bereitstellung der post-mortem-Gehirne zur Bestimmung der 7-Ketocholesterol-Konzentrationen in Gehirnen von MS-Patienten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. med. Orhan Aktas, aus der Abteilung von Prof. Dr. med. Frauke Zipp von Institut für Neuroimmunologie des Universitätsklinikum der Charité Berlin, für die Mitarbeit an den Untersuchungen am EAE-Modell und die Bereitstellung des Tiermaterials.

Dr. Mogens Kruhøffer (PhD, MSc) vom Universitätsklinikum Aarhus in Dänemark danke ich für die Durchführung der Mikro-Array-Analyse.

Für die enge Zusammenarbeit bei den Slice-Versuchen bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Antje Diestel und Ines Häke.

Besonderen Dank verdienen weiterhin die technischen Assistentinnen, des Instituts für Anatomie, Abteilung Zell- und Neuroanatomie der Humboldt-Universität Berlin, Universitätsklinikum der Charité, Anja Gräfe und Brita Scholte für die Mitarbeit bei verschiedenen Untersuchungen.

Allen MitarbeiterInnen der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Oliver Ullrich am Instituts für Anatomie, Abteilung Zell- und Neuroanatomie der Humboldt-Universität Berlin, Universitätsklinikum der Charité, möchte ich für ihre Diskussionsbereitschaft und all die lustigen Stunden inner- und außerhalb des Labors danken.

Uta, Doreen, Maren, Fredericke und Andi danke ich für die Überprüfung der schriftlichen Arbeit auf Ausdruck, Rechtschreibung und Grammatik.

Schließlich möchte ich meiner Familie für alle seelisch-moralische Unterstützung während meiner Studenten- und Doktorandenzeit danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Dagmar Hackel
Geboren am : 24. August 1977 in Lutherstadt Eisleben
Nationalität : deutsch
Familienstand : ledig
Beruf : Biochemikerin

Schulbildung

1984 - 1986 POS Fritz - Heckert Eisleben
1986 - 1991 POS John - Schehr Eisleben
Schule mit erweitertem Russisch-Unterricht
1991 - 1996 Martin - Luther - Gymnasium Eisleben

Universitäre Ausbildung

1996 - 2001 Studium der Biochemie an der Martin - Luther - Universität Halle mit
Schwerpunkten Pflanzenbiochemie, Analytische Biochemie
Datum des Diploms
Gesamtnote der Diplomprüfung: gut (2,3)

Diplomarbeit

Untersuchungen zum Thiolstoffwechsel unter Schwermetall-Stress in *Sphagnum fallax*.

Berufliche Tätigkeiten

2002 – 2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Zell- und Neurobiologie des Instituts
für Anatomie am Universitätsklinikum Charité

Publikationen

DIESTEL A, AKTAS O, **HACKEL D**, HAKE I, MEIER S, RAINE CS, NITSCH R, ZIPP F AND 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*, 198(11):1729-40

Beiträge auf internationalen und nationalen Konferenzen (Abstracts)

A. DIESTEL, I. HÄKE, **D. HACKEL**, O. AKTAS, R. NITSCH, F. ZIPP AND O.ULLRICH, 2002: Neuronal damage by oxysterol-induced microglia activation—an injurious neuron-microglia-crosstalk? *Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde. Germany.*

A. DIESTEL, **D. HACKEL**, I. HÄKE, F. ZIPP, R. NITSCH AND O. ULLRICH, 2002: Microglia-mediated neuronal injury by 7ketocholesterol found in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany .*

O. ULLRICH, A. DIESTEL, **D. HACKEL**, I. HAEKE, O. AKTAS, F. ZIPP AND R.NITSCH, 2002: Activation of microglia cells and induction of neuronal injury by cholesterol oxides found in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *32th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Orlando, USA.* Awarded as Editor´s bronze choice abstract in *Neurobiology of Lipids* Vol.1, 5 (2002)

A. DIESTEL; AKTAS, O.; **D. HACKEL**;I. HÄKE; S. MEIER; C. S. RAINE; F. ZIPP; R. NITSCH AND O. ULLRICH, 2003: Oxsterol-induced neuronal damage during neuroinflammation. *6th European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Berlin, Germany*

D.HACKEL, A. DIESTEL, O. AKTAS, I. HÄKE, S. MEIER, C.S. RAINE, R. NITSCH, F. ZIPP AND O. ULLRICH, 2003: Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *7th Joint Meeting of the German Signal Transduction Society, Weimar, Germany.*

D. HACKEL, P. SCHMIDT, R. NITSCH AND O. ULLRICH, 2004: Proinflammatory activation of BV-2 microglial cells by cholesterol breakdown products via CD36 and MAPK-signalling. *35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA.*

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone – Signalwege oxidativ modifizierter Lipide

im Instituts für Anatomie, Abteilung Zell- und Neuroanatomie der Humboldt-Universität Berlin, Universitätsklinikum der Charité

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Fakultät für Naturwissenschaften das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 25. April 2005

Dagmar Hackel