

**Faktoren des oligodendroglialen Zelltods
und der Remyelinisierung in einem Tiermodell
der Multiplen Sklerose und der humanen
Entwicklung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

im Fachbereich Biologie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Alexander Helmut Wilhelm Lürbke

aus Münster

Münster, 2012

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Prüfer
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Tanja Kuhlmann
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Eva Liebau

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 2013

Tag der Promotion: 12. April 2013

Practice what you preach

Testament

Meinen Eltern
Erika Anna Bernhardine Lürbke
&
Burckhard Heinrich Lürbke

Vorbemerkung

Ich habe in der vorliegenden Arbeit folgende Konventionen befolgt:

Symbole für Gene *kursiv*:

humane Gene in Großbuchstaben (*GENSYMBOL*),

murine Gene beginnen mit einem Großbuchstaben gefolgt von Kleinbuchstaben (*Gensymbol*).

Gene aus der Hefe komplett klein (*gensymbol*)

Symbole für Proteine:

humane und murine Proteine in Großbuchstaben (*GENSYMBOL*).

Proteine aus der Hefe beginnen mit einem Großbuchstaben gefolgt von Kleinbuchstaben (*Gensymbol*)

Eine Ausnahme stellen die schematischen Darstellungen von Signalkaskaden dar, in denen ich proteine-darstellende Ellipsen mit einem Großbuchstaben gefolgt von Kleinbuchstaben beschriftet habe (*Gensymbol*). Wenn ich im Text „*Gensymbol*“ verwendet habe, bezieht es sich auf das Gen und das Protein. Ausgeschriebene Namen, wie β -Catenin, beziehen sich immer auf das Protein.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Zusammenfassung	IX
Abstract	X
1. Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.2 Oligodendrozyten und Remyelinisierung.....	4
1.3 Cuprizonmodell.....	7
1.4 Apoptose	9
1.5 Puma und Noxa	12
1.6 TCF7L2 und HDACs	15
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Versuchstiere	18
2.1.2 Zelllinien	19
2.1.3 Medien und Zusätze	19
2.1.4 Oligonukleotide.....	20
2.1.5 Geräte	21
2.1.6 Verbrauchsmittel.....	23
2.1.7 Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen.....	24
2.1.8 Chemikalien.....	25
2.1.9 Antikörper.....	29
2.1.10 Puffer und Lösungen.....	31
2.1.11 Software	34
2.2 Methoden	34
2.2.1 Isolierung und Amplifikation von Nukleinsäuren	34
2.2.2 RNA Konzentrationsbestimmung	35
2.2.3 Reverse Transkription	36
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.2.5 Quantitative Realtime-PCR	37
2.2.6 Mikroarray	39

2.2.7	Agarose Gelelektrophorese	39
2.2.8	Kultivierung von Zelllinien	40
2.2.9	Präparation und Kultivierung von primären murinen Mikroglia	40
2.2.10	Aktivierung von murinen Mikroglia <i>in vitro</i>	41
2.2.11	Kryokonservierung	41
2.2.12	Zelltod und Proliferations-Tests	41
2.2.13	Tierexperimentelle Methoden	42
2.2.14	Histologische Techniken	43
2.2.15	Immunhistochemische Färbungen	45
2.2.16	Quantifizierung der Histologie	47
2.2.17	Statistische Analyse	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Identifikation von Kandidatengenen für den oligodendroglialen Zelltod im Cuprizonmodell	51
3.2	Genexpression in der oligodendroglialen Zelllinie CG-4	52
3.3	Rolle von PUMA im Cuprizonmodell	54
3.3.1	Expression von Myelinenen in <i>Puma</i> ^{-/-} Mäusen	54
3.3.2	Oligodendroglialer Zelltod im <i>Corpus callosum</i> von <i>Puma</i> ^{-/-} Mäusen	56
3.3.3	Aktivierung der Mikroglia	59
3.4	Rolle von PUMA bei der Aktivierung von primären Mikroglia <i>in vitro</i>	61
3.5	Rolle von NOXA im Cuprizonmodell	62
3.5.1	Oligodendroglialer Zelltod im <i>Corpus callosum</i> von <i>Noxa</i> ^{-/-} Mäusen	62
3.5.2	Aktivierung der Mikroglia	65
3.6	TCF7L2 in der murinen Entwicklung	66
3.7	TCF7L2 in der Remyelinisierung der Maus	68
3.8	TCF7L2 in der humanen Myelinisierung	69
3.9	HDAC2 und β -Catenin in Myelinisierungsprozessen	72
4.	Diskussion	73
4.1	Identifikation von Kandidatengenen für den oligodendroglialen Zelltod im Cuprizonmodell	73

4.2 Genexpression in der oligodendroglialen Zelllinie CG-4 nach Zelltodinduktion.....	74
4.3 Rolle von PUMA im cuprizoninduzierten Zelltod.....	76
4.3.1 Aktivierung der Mikroglia.....	78
4.4 Rolle von NOXA im cuprizoninduzierten Zelltod.....	79
4.5 TCF7L2 und seine Bindungspartner HDAC2 und β -Catenin in Myelinisierungsprozessen.....	81
Literaturverzeichnis.....	84
Anhang.....	99
Publikationen.....	102
Danksagung.....	103
Lebenslauf.....	104

Abkürzungen

Abs	Absorption
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
Apr	engl. <i>ATL-derived PMA-responsive gene</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bcl-2	engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl2a1	engl. <i>Bcl-2 related protein 2A1</i>
Bcl2l1	engl. <i>Bcl-2 like protein 1</i>
Bcl2l2	engl. <i>Bcl-2 like protein 2</i>
BH3	Bcl-2 Homologiedomäne 3
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C/Ebp	engl. <i>CCAAT-enhancer binding proteins</i>
cDNA	komplementäre DANN (engl. <i>complementary DNA</i>)
Chop	C/Ebp homologes Protein
CNP	2',3'-zyklische Nukleotid 2'-Phosphodiesterase (engl. <i>2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>)
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
DAPI	Diamidino-2-phenylindol
DISC	engl. <i>Death-inducing signaling complex</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i>)

dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Eppstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	engl. <i>enzymelinked immunosorbant assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>Fluorescence activated cell sorting</i>)
FASL	Fas-Ligand
FKS	fetales Kälberserum
Fox0	engl. <i>Forkhead box class 0</i>
harp	humanes saures ribosomales Protein (engl. <i>human acidic ribosomal protein</i>)
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämotoxylin Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hif1α	engl. <i>Hypoxia inducible factor 1α</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IFNγ	Interferon gamma
IL1β	Interleukin 1 beta
IMSGC	engl. <i>International Multiple Sclerosis Genetics Consortium</i>

INOS	Induzierbare Stickstoffmonooxidase
kD	Kilodalton
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LFB	Luxol Fast Blue
LPS	Lipopolysaccharid
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-Basisches Protein
Mcl1	engl. <i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
med	medizinisch
MEF	embryonale Mausfibroblasten (engl. <i>murine embryonic fibroblasts</i>)
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mikrowelle
MW	Mittelwert
NAD	Nikotinamiddinukleotid
NAD(P)H	Nikotinamidadeninnukleotidphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NG2	Neuron/Glia Antigen 2
OPC	oligodendrogliale Vorläuferzelle (engl. <i>oligodendroglial precursor cell</i>)
PAS	Perjodsäure-Leukofuchsin
PBS	Phosphat-Salzpuffer (engl. <i>Phosphat-buffered sa</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain-reaction</i>)

PDGFRα	engl. <i>Platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PLP	Proteolipid Protein
PMA	Tetradecanoylphorbolacetat (engl. <i>Phorbol 12-myristate 13-acetat</i>)
Pmaip1	PMA-induziertes Protein 1
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
POX	Peroxidase
PSG	Penicillin Streptomycin Glutamat
Puma	engl. <i>P53 upregulated mediator of apoptosis</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>quantitative Reverse Transcriptase Chainreaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Rotationen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEM	Stabdardfehler (engl. <i>Standard Error of the Mean</i>)
Sir2	engl. <i>silent information regulator 2</i>
Sirt	Sirtuin
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillinamin
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSW	Schwangerschaftswoche
SVZ	subventrikuläre Zone
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TBS	Tris-Borat-Salzpuffer (engl. <i>Tris Borat buffered saline</i>)
T_H-Zelle	T-Helferzelle
TMED	Tetramethylethylendiamin
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	Wildtyp
WTCCC2	engl. <i>Wellcome Trust Case Control Consortium 2</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung
β₂m	beta 2 Mikroglobulin

Zusammenfassung

Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste entzündlich demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) im Menschen. Charakteristisch für die MS sind demyelinisierte Läsionen mit entzündlichen Infiltraten, in welchen es auch zu oligodendroglialem Zelltod kommt. Der erste Teil der Dissertation beschäftigt sich mit dem oligodendroglialem Zelltod, der nur unvollständig verstanden ist. In einem toxisch demyelinisierenden Tiermodell der MS, dem Cuprizonmodell, und auch in der MS selbst zeigt der oligodendrogliale Zelltod apoptotische Merkmale, wie kondensiertes Chromatin und die Expression von proapoptischen Faktoren. Unter diesen Faktoren werden hier zunächst die Gene *Puma* und *Noxa* als Kandidatengene für eine zentrale Rolle im oligodendroglialen Zelltod identifiziert. In weiteren Versuchen mit den jeweiligen Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Puma*, aber nicht *Noxa* essentiell für den oligodendroglialen Zelltod im Tiermodell ist. Die gezeigten Ergebnisse lassen mit dem bereits vorhandenen Wissen die Vermutung zu, dass *Puma* auch im oligodendroglialen Zelltod der MS eine Rolle spielen kann.

Im zweiten Teil der Dissertation werden Myelinisierungs- und Remyelinisierungsprozesse im Tiermodell und im Menschen hinsichtlich der Beteiligung des Transkriptionsfaktors *Tcf7l2* betrachtet. Für *Tcf7l2* wurde bereits in der Maus gezeigt, dass er für die Myelinisierung in der Entwicklung mitverantwortlich ist. Hier konnte ich zeigen, dass *Tcf7l2* auch in der menschlichen Entwicklung mit der Myelinisierung in Verbindung steht. Auch in der Remyelinisierung nach der toxischen Demyelinisierung im Cuprizonmodell der Maus findet sich eine Beteiligung von *Tcf7l2*. Im Menschen konnte ich ebenfalls Expression von *Tcf7l2* bei Remyelinisierungsprozessen beobachten, jedoch ist diese Expression nicht auf diese Prozesse limitiert und wird auch in anderen Zellen als den Oligodendrozyten beobachtet.

Zusammengenommen konnte ich zeigen, dass der oligodendrogliale Zelltod im Cuprizonmodell über den proapoptischen Faktor *Puma* vermittelt wird und *Tcf7l2* eine Rolle in den untersuchten Myelinisierungsprozessen spielt, aber nicht auf diese Rolle beschränkt ist.

Abstract

Multiple Sclerosis (MS) is the most common demyelinating, inflammatory disease of the central nervous system (CNS) in man. The characteristic hallmarks of MS are demyelinating lesions with inflammatory infiltrates in which dying oligodendrocytes are present. The first part of this thesis is dedicated to oligodendroglial cell death which is still not fully understood. In MS and its animal model of toxic demyelination, the cuprizone model, dying oligodendrocytes show morphological characteristics of apoptosis like condensed chromatin and express apoptotic factors. Among these factors are the proapoptotic genes *Puma* and *Noxa* which are here identified as candidate genes for a pivotal role in oligodendroglial cell death. Further experiments with the respective knockout mice have shown an essential role for *Puma* but not *Noxa* in oligodendroglial cell death in the cuprizone model. The presented results and the existing knowledge support the conclusion that *Puma* also may play a role in oligodendroglial cell death in MS.

The second part of this thesis attends to myelination and remyelination in mice and men regarding the involvement of the transcription factor *Tcf712*. It has already been shown that *Tcf712* is co-responsible for the myelination in mice. Here I demonstrate that *Tcf712* is also involved in human developmental myelination and in the remyelination after toxic demyelination in mice. I was also able to find *Tcf712* expression in remyelination processes in remyelinating MS lesions, but *Tcf712* expression is neither limited to the myelination processes nor oligodendrocytes.

Taken together I was able to show that oligodendroglial cell death in toxic demyelination is mediated by the proapoptotic factor *Puma* and that the transcription factor *Tcf712* is involved in, but not limited to myelination processes.

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische, entzündlich demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und wurde als erstes von Jean-Martin Charcot im Jahr 1868 als eigenständige Erkrankung beschrieben (Charcot, 1868). Die Erkrankung bricht meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr aus, wobei Frauen ein dreifach höheres Risiko als Männer haben an MS zu erkranken (Orton et al., 2006). MS ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Die Prävalenz liegt in West-Europa im Durchschnitt bei 100 und in Deutschland bei 150 Erkrankten pro 100.000 Einwohner (Hein und Hopfenmüller, 2000; Koch-Henriksen und Sorensen, 2010). Die Symptome der MS sind heterogen, am häufigsten sind Sehstörungen, Blasenstörungen, Bewegungsunsicherheit (*med.*: Ataxie), Gefühlsstörungen, Augenzittern (*med.*: Nystagmus), Kraftlosigkeit und kognitive Störungen. Der Verlauf der MS ist nicht vorhersagbar und wird grob in die folgenden vier Verlaufsformen unterteilt (Lublin, 2004):

Schubförmig remittierende MS (RR-MS, engl.: relapsing-remitting MS)

Die häufigste Form (85-90 %) ist die RR-MS, bei der es zu Krankheitsschüben kommt, deren zeitliche Abfolge nicht vorhersagbar ist und von denen sich die Patienten zunächst vollständig erholen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung bleiben jedoch nach weiteren Schüben immer mehr neurologische Defizite bestehen. Bei der RR-MS kommt es zwischen den Schüben zu keiner weiteren Verschlechterung.

Primär progrediente MS (PP-MS, engl.: primary progressive MS)

Ca. 10 % der gesamten MS-Patienten erkranken an der PP-MS, die nicht durch Schübe, sondern vielmehr durch eine beständige Verschlechterung gekennzeichnet ist. Es kommt nur gelegentlich zu Phasen, in denen die Krankheit langsamer voranschreitet.

Sekundär progrediente MS (SP-MS engl.: secondary progressive MS)

Ca. 50 % der sich zunächst als RR-MS darstellenden Krankheitsverläufe zeigen in einer späteren Krankheitsphase einen progredienten Verlauf, bei dem sich die Erkrankung fortlaufend mit vereinzelt oder ohne weiter auftretende Schübe verschlimmert.

Progrediente schubförmige MS (PR-MS, engl.: progressive relapsing MS)

Die PR-MS ist mit 5-6 % aller MS-Erkrankungen seltenste Form. Bei der PR-MS verschlechtert sich der Zustand fortlaufend; daneben kommt es jedoch auch zu Krankheitsschüben, deren Symptome sich, ähnlich wie bei der RR-MS, wieder zurückbilden können.

Die genaue Pathogenese der MS ist bis heute unbekannt, aber es wird angenommen, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt, bei der es zu einer fehlgeleiteten Immunantwort gegen Myelinantigene kommt (Nosworthy et al., 2000). Dies wird durch großangelegte genetische Untersuchungen des *International Multiple Sclerosis Genetics Consortiums* (IMSGC) und des *Wellcome Trust Case Control Consortiums 2* (WTCCC2) gestützt, die zeigen, dass in Genomen von MS-Patienten vor allem Gene des Immunsystems und unter diesen vermehrt Gene der Zelloberflächenrezeptoren, die bei der Differenzierung von T-Helferzellen (T_H-Zellen) eine Rolle spielen, Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) aufweisen (Sawcer et al., 2011). Der erste Locus der für MS-Anfälligkeit identifiziert wurde, befindet sich auf Chromosom 6 (Region: 6p21.3) und codiert für das Humane Leukozyten Antigen (HLA) (Jersild et al., 1972; Naito et al., 1972). Weitere Gene, die mit MS in Verbindung gebracht werden, sind *TNFRSF1A*, *IRF8*, *CD6* (De Jager et al., 2009b), *IL7R*, *IL2RA*, (Hafler et al., 2007), *CLEC16A* (Hafler et al., 2007; IMSGC, 2009b), *CD58* (De Jager et al., 2009a), *TYK2* (Burton et al., 2007), *STAT3* (Jakkula et al., 2010), *IL12A*, *MPHOSPH9/CDJ2AP1*, *KIF21B*, *TMEM39A* (Hafler et al., 2007; IMSGC, 2010a), *CYP27B1* (IMSGC, 2009a), *CD226* (IMSGC, 2009b), *CD40* (IMSGC, 2009a), *CBLB* (Sanna et al., 2010) und *RGS1* (IMSGC, 2010b). Dass die Genetik eine Rolle in der Pathogenese der MS spielt, ist schon seit längerem unumstritten. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Verwand-

ten zweiten Grades liegt bei 1 % , bei Verwandten ersten Grades bei 3 % und bei eineiigen Zwillingen bei 25 % (Robertson et al., 1996; Willer et al., 2003). Diese Zahlen legen nahe, dass es sich um eine multifaktorielle Vererbung handelt (Oksenberg und Baranzini, 2010).

Einen weiteren Beleg, dass eine MS-Erkrankung nicht allein mit genetischen Faktoren erklärt werden kann, erbrachten 2010 Baranzini und Kollegen. Sie verglichen die beiden gesamten Genome eines eineiigen MS-diskordanten Zwillingspaars und fanden keine Unterschiede zwischen den beiden sequenzierten Genomen. Auch die Epigenome der CD4⁺ Lymphozyten und Transkriptomte dieses Paares sowie zwei weiterer diskordanter eineiiger Zwillingspaare wiesen keine nennenswerten Unterschiede zueinander auf. Einzig der Methylierungsstatus der CD4⁺ Lymphozyten wies zwischen 2 und 176 Unterschiede (bei insgesamt 2×10^6 CpG Dinukleotiden) auf (Baranzini et al., 2010). Neben der Genetik tragen somit wohl auch Umweltfaktoren ihren Teil zur Pathogenese der MS bei. So gibt es eine Zunahme der Erkrankungen mit der Entfernung vom Äquator, was mit einem Vitamin D Mangel in Verbindung gebracht wird (Hammond et al., 1988; Kampman und Brustad, 2008; Kurtzke, 1980). Des Weiteren wird diskutiert, ob eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) einen Einfluss auf die Erkrankung hat. Denn zumindest bei unter MS leidenden Kindern ist der Anteil der mit EBV-Infizierten mit 86 % signifikant höher als bei nicht an MS erkrankten Altersgenossen (64 %) (Banwell et al., 2007).

Pathologisch ist die MS charakterisiert durch eine Infiltration des ZNS mit Immunzellen, Demyelinisierung, Gliose und einer axonalen Degeneration. In Läsionen, die in der grauen Substanz gelegen sind, kommt es zudem zu einem variablen Nervenzellverlust. Das zentrale histopathologische Merkmal der MS sind zeitlich und räumlich disseminierte Läsionen (Lublin, 2004). Diese treten in der weißen und auch in der grauen Substanz (Kortex) auf (Geurts et al., 2005). In den Läsionen laufen mehrere Prozesse, z.T. gleichzeitig ab, darunter Entzündung, De- und Remyelinisierung, Schwund der Oligodendrozyten und eine astrozytäre Gliose. Die Läsionen entstehen wahrscheinlich durch eine gesteigerte Durchgängigkeit in der Blut-Hirn-Schranke, der es Leukozyten ermöglicht, in das normalerweise vom Immunsystem abgeschottete ZNS einzudrin-

gen. Befinden sich unter ihnen myelinantigenspezifische Leukozyten, können diese eine Immunkaskade in Gang setzen, welche in der Bildung einer akut entzündlichen, demyelinisierenden Läsion endet (Raine, 1994). Der in den Läsionen auftretende axonale Schaden ist schlussendlich ursächlich für die körperlichen Symptome, die die MS hervorruft (Matthews et al., 1998).

Das Erscheinungsbild der MS-Plaques ist in initialen Läsionstadien sehr heterogen; daher schlugen Lucchinetti und Kollegen 2000 die Einteilung von MS-Läsionen in 4 verschiedene histopathologische Muster vor (Lucchinetti et al., 2000):

Muster I und II zeigen eine Demyelinisierung die von einer T-Zellen und Makrophagen/aktivierten Mikroglia dominierten Entzündung begleitet ist, was an eine Antikörper-vermittelte autoimmune Enzephalomyelitis erinnert.

Muster III und IV zeigen gegenüber den Mustern I und II einen deutlichen oligodendroglialen Verlust, auch in der angrenzenden normal erscheinenden weißen Substanz. In Muster III weisen die vorhandenen Oligodendrozyten eine Dysregulation der Myelinproteine auf. So sind diese Oligodendrozyten negativ für Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), während 2',3'-Zyklisches Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNP), Proteolipid Protein (PLP) und Myelin-Basisches Protein (MBP) weiterhin nachweisbar sind. Auch in der angrenzenden normal erscheinenden weißen Substanz ist eine Verringerung der Oligodendrozyten zu beobachten. Es werden kaum oder keine Markschatenherde gefunden.

Die Interpretation dieser Befunde ist umstritten; die unterschiedlichen histologischen Muster können entweder unterschiedliche Pathomechanismen bei der Entstehung von MS-Läsionen oder unterschiedliche Läsionsstadien repräsentieren (Barnett et al., 2006; Barnett und Prineas, 2004).

1.2 Oligodendrozyten und Remyelinisierung

Die Oligodendrozyten sind die myelinbildenden Zellen des ZNS. Wie die myelinbildenden Zellen des peripheren Nervensystems (PNS), die Schwann-

Zellen, gehören sie zu den Gliazellen. Oligodendrozyten und Schwann-Zellen myelinisieren die Axone, indem sie diese mit Fortsätzen ihrer Plasmamembran in mehreren Schichten umwickeln, welche nach erfolgter Verdichtung die Myelinscheiden bilden (Simons und Trotter, 2007). Oligodendrozyten können mehrere Internodien um mehrere Axone bilden und versorgen, während Schwann-Zellen auf ein Internodium beschränkt bleiben (Blakemore, 1981; Fanarraga et al., 1998).

Die Myelinscheide besteht aus mehreren Schichten von kompaktem Myelin, welches aus den Zellmembranen der Ausläufer der myelinisierenden Zellen gebildet wird, nachdem durch die Verdichtung das Zytoplasma aus den Zellfortsätzen verdrängt wurde. Das Lipid-/Proteinverhältnis dieser Membran ist gegenüber dem Verhältnis anderer zellulärer Membranen, welches gewöhnlich bei 1 : 1 liegt, auf 1 : 3 erhöht (Norton und Poduslo, 1973). In der Membran finden sich zwar keine myelin-spezifischen Lipide, aber eine spezifische Anreicherung der Membranlipide Cerebrosid, Sulfatid, Ethanolamin Plasmalogen und Cholesterin (Eckhardt, 2008; Nagan und Zoeller, 2001; Norton und Cammer, 1984; Stoffel und Bosio, 1997). Unter den Proteinen der Membran findet man hingegen myelinspezifische Proteine, von denen im ZNS die wichtigsten MBP, PLP, MAG, MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) und CNP sind (Trapp und Kidd, 2004). Die Myelinscheide umgibt das komplette Axon mit Ausnahme der Ranvierschen Schnürringe, welche die Myelinscheide in einzelne Internodien trennen und an denen das Axon auf einer Länge von weniger als 1 μm (*Nervus opticus*) bis 5 μm (große Nervenfasern im Rückenmark) frei liegt (Fraher, 1973; McDonald und Ohlrich, 1971). Am Rand der Internodien befindet sich in den Zytoplasmaringen nicht-kompaktes Myelin, in welchem, im Gegensatz zum kompakten Myelin, Zytoplasma vorhanden ist. Im nicht-kompakten Myelin befinden sich neben Zytoskelettkomponenten auch Mitochondrien, so werden Stabilität und Energieversorgung des Myelins sichergestellt (Trapp und Kidd, 2004).

Durch die Myelinisierung wird die saltatorische Reizleitung ermöglicht, ein gegenüber der Reizleitung von unmyelinisierten Axonen bis zu einhundertmal schnellerer Transport von Aktionspotentialen (Nave, 2010). Bei diesem Trans-

port werden die Aktionspotentiale jeweils an den Ranvierschen Schnürringen gebildet. Dies hat den weiteren Vorteil, dass der ATP-Verbrauch des Neurons gegenüber unmyelinisierten Axonen verringert wird, da nicht mehr das gesamte Axon depolarisiert werden muss, sondern dies nur an den Ranvierschen Schnürringen stattfindet. In Folge dessen müssen die Na⁺/K⁺-ATPasen weniger Arbeit verrichten, als in unmyelinisierten Axonen (Hartline und Colman, 2007). Neben der Beschleunigung und Effizienzsteigerung der Reizleitung sorgt die Myelinscheide auch für Schutz vor Aktionspotentialen von kreuzenden Neuronen. Ferner besitzen Myelinproteine auch neuroprotektive Eigenschaften; das Fehlen einzelner Myelinproteine, wie z.B. PLP oder CNP führt bei entsprechenden transgenen Mausmodellen zu einer axonalen Degeneration (Griffiths et al., 1998; Lappe-Siefke et al., 2003; Nave, 2010). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Remyelinisierung die Axone vor mit Demyelinisierung assoziiertem axonalen Schaden schützt (Irvine und Blakemore, 2008). Auch bei der MS ist in remyelinisierten Regionen weniger axonaler Schaden, als in chronisch demyelinisierten Regionen zu beobachten (Kornek et al., 2000).

Die Remyelinisierung ist ein regenerativer Prozess, bei dem die Myelinscheide demyelinisierter Axone wiederhergestellt wird. Die Remyelinisierung stellt somit die saltatorische Reizleitung wieder her und beseitigt Leitungsblöcke und Funktionsdefizite (Jeffery und Blakemore, 1997; Liebetanz und Merkler, 2006; Smith et al., 1979). Jedoch unterscheiden sich remyelinisierte Axone von normal myelinisierten Axonen durch eine dünnere Myelinscheide (Ludwin und Maitland, 1984). So ist die Dicke der Myelinscheide nicht mehr abhängig vom Durchmesser des Axons, sondern alle remyelinisierten Axone weisen ungefähr die gleiche Dicke der Myelinscheide auf (Fancy et al., 2011).

Die Remyelinisierung erfordert die Bildung neuer remyelinisierender Oligodendrozyten, die aus oligodendroglialen Vorläuferzellen (OPCs, engl. *oligodendroglial progenitor cells*) hervorgehen (Ffrench-Constant und Raff, 1986; Sim et al., 2006). Rekrutiert werden die frühen oligodendroglialen Vorläuferzellen aus der Umgebung der Demyelinisierung (Zawadzka et al., 2010) oder der subventrikulären Zone (SVZ) (Menn et al., 2006). Als frühe Vorläuferzellen exprimieren sie die molekularen Marker *platelet derived growth*

factor receptor alpha (PDGFR α) und das Sulfat Proteoglykan (NG2) (Nishiyama et al., 1999). Die Vorläuferzellen werden durch die Demyelinisierung aktiviert und migrieren zum Axon, wo sie zu späten Vorläuferzellen reifen, verschiedene Transkriptionsfaktoren wie OLIG2 und NKX2.2 exprimieren (Fancy et al., 2004; Kuhlmann et al., 2008), proliferieren (Franklin, 2002) und zu reifen Oligodendrozyten ausdifferenzieren, welche die intakten demyelinisierten Axone remyelinisieren (Franklin und French-Constant, 2008).

Auch in MS-Läsionen kommt es nach der Demyelinisierung zur Remyelinisierung. Jedoch nimmt die Remyelinisierungsfähigkeit mit Fortschreiten der Krankheit ab. So kommt es in der frühen MS noch häufig zu einer ausgeprägten Remyelinisierung, während in chronischen Läsionen häufig nur der Rand der Läsionen Zeichen von Remyelinisierung aufweist (Goldschmidt et al., 2009). Vollständig remyelinisierte Läsionen, so genannte *shadow plaques* oder Markschattenherden, machen nur ca. 20 % der chronischen MS-Läsionen aus (Goldschmidt et al., 2009; Patrikios et al., 2006). Da auch in chronischen Läsionen OPCs nachweisbar sind, ist das Scheitern der Remyelinisierung in chronischen Läsionen am ehesten mit einer blockierten Differenzierung der OPCs zu erklären (Chang et al., 2002; Kuhlmann et al., 2008).

1.3 Cuprizonmodell

Ein Tiermodell, welches für die Erforschung der Remyelinisierung genutzt wird, ist das Cuprizonmodell. Bei diesem Modell wird adulten Mäusen der Kupferchelator Cuprizon (Bis-(cyclohexanon)-oxaldihydrazon) für bis zu 42 Tage in einer Konzentration von 0,1 – 0,3 % verfüttert. In Folge dessen kommt es zur Demyelinisierung des Großhirns (*Corpus callosum*, Kortex, Hippocampus, *Cerebellum*, *Pedunculi cerebelli*), nur wenige Areale bleiben ausgespart, wie z.B. die *Nervi optici* und das Rückenmark (Blakemore, 1972; Groebe et al., 2009; Hoffmann et al., 2008; Matsushima und Morell, 2001).

Bei Konzentrationen von mehr als 0,3 % kommt es häufig zur Bildung von Megamitochondrien in der Leber, Gewichtsverlust und gelegentlich zur Ausbildung eines *Hydrocephalus* (Carlton, 1967; Suzuki, 1969).

Histologisch ist im Verlauf der Cuprizongabe ein Anstieg sowohl an Zellen mit apoptotischer Morphologie als auch aktivierter Caspase 3 im oligodendrozytenreichen *Corpus callosum* zu beobachten, während es gleichzeitig zu einer Abnahme der reifen Oligodendrozyten und Demyelinisierung kommt. Dies wird begleitet von einer Infiltration mit aktivierten Mikroglia, die das Myelin und die apoptotischen Zellen phagozytieren (Hesse et al., 2010). Hingegen findet man kaum T-Zellen und aus dem Blut stammende Monozyten (Remington et al., 2007).

Bereits während der Demyelinisierung kommt es zu einer Zunahme von NG2-positiven (NG⁺) Vorläuferzellen, die schließlich zu Oligodendrozyten differenzieren und das *Corpus callosum* nach Absetzen des Cuprizons nahezu vollständig remyelinisieren (Mason et al., 2000)

Die Ursache für den oligodendroglialen Zelltod und die Demyelinisierung sind bis heute nur unvollständig aufgeklärt (Kipp et al., 2009). Es wurde jedoch gezeigt, dass Mäuse ohne das für den pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor P53 kodierende Gen (*p53*^{-/-}) geringere Demyelinisierung und verringerte mikrogliale Aktivierung aufweisen. In Wildtyp-Tieren (*p53*^{+/+}) konnte ein ähnlicher Effekt mittels des P53-Inhibitors Pifithrin- α gezeigt werden (Li et al., 2008). Molekularbiologisch ist das Cuprizonmodell unter anderem charakterisiert durch Abnahme der Expression der Myelogene *Mbp* und *Mag* (Morell et al., 1998) und differentielle Expression von Apoptose-assoziierten Genen wie *P53*, *Fas* und *Xiap* (Hesse, 2010; Li et al., 2008).

Das Cuprizonmodell bildet als ein Modell der Demyelinisierung die Multiple Sklerose nicht in ihrer Gesamtheit ab. So spielt in diesem Modell die Autoimmunität keine Rolle. Für diesen Aspekt wird das Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) herangezogen. Das Cuprizonmodell zeigt jedoch Charakteristika der nach Muster III klassifizierten MS-Läsionen und erlaubt Einblicke in die Mechanismen des oligodendroglialen Zelltodes und der Remyelinisierung.

1.4 Apoptose

Apoptose ist die Bezeichnung für den kontrollierten Zelltod in Vielzellern, der vom unkontrollierten Zelltod, der Nekrose, unterschieden wird (Kerr et al., 1972). Die Apoptose spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Gewebemöostase¹ (Evan und Vousden, 2001; Meier et al., 2000). Durchläuft eine Zelle die Apoptose, ist dies durch morphologische Veränderungen der Zelle gekennzeichnet. So schrumpft und rundet sich die Zelle zunächst ab und zieht sich von benachbarten Zellen zurück. Des Weiteren kondensiert das Chromatin, es kommt zur DNA-Fragmentierung und schließlich schnüren sich von der Plasmamembran chromatinhaltige Bläschen ab, die als apoptotische Körper bezeichnet und von Makrophagen phagozytiert werden (Taylor et al., 2008b). So kommt es nicht zu einer Freisetzung von Zellbestandteilen wie bei der Nekrose, wodurch Entzündungsreaktionen vermieden werden. Die intrazellulären Vorgänge während der Apoptose werden zu einem Großteil von einer bestimmten Klasse von Cystein-Proteinasen katalysiert. Diese schneiden entscheidende Proteine in der Zelle und machen diese somit funktionsunfähig oder aktivieren sie für weitere proapoptotische Funktionen (Coleman et al., 2001; Luthi und Martin, 2007). Diese Caspasen genannten Proteasen können über verschiedene Wege aktiviert werden. Anhand der Initiation unterscheidet man den extrinsischen und den intrinsischen Weg.

Die Initiation durch ein extrinsisches Signal entsteht durch das Binden eines Liganden, wie den FAS-Liganden (FASL) oder Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α), an die extrazelluläre Domäne eines Rezeptor der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Familie. Dies führt zur Ausbildung des sogenannten *Death inducing signaling complex* (DISC), in welchem die Caspase 8 aktiviert wird. Die aktivierte Caspase 8 schneidet ihrerseits die zentralen Effektor-Caspasen 3, 6 oder 7 und aktiviert sie somit (Waring und Mullbacher, 1999).

Die Initiation der Apoptose über den intrinsischen Weg erfolgt hingegen an den Mitochondrien und wird über ein Zusammenspiel von anti- und proapoptotischen *B-Cell lymphoma-2* (Bcl-2)-Proteinen reguliert (Youle und Stras-

¹ Gleichgewicht von Proliferation und Zelltod

ser, 2008). In Folge von DNA-Schaden kommt es beispielsweise zur Expression des Transkriptionsfaktors P53, was zur Transkription einer Vielzahl von pro- und anti-apoptotischen Genen führt. Unter den pro-apoptotischen Proteinen spielt eine Unterfamilie der Bcl-2-Proteine, die Bcl-2 Homologiedomäne 3 (BH3)-only Proteinfamilie, eine wichtige Rolle. (Zong et al., 2001). Diese aktivieren die pro-apoptotischen Bcl-2 Effektorproteine BAX und BAK. Die Aktivierung verläuft entweder direkt oder indirekt über Hemmung der anti-apoptotischen Bindungspartner von BAX und BAK. Für die BH3-only Proteine BIM, BID und PUMA wird eine direkte Aktivierung diskutiert, während den anderen Vertretern der Familie nur eine indirekte Aktivierung von BAX und BAK zugeschrieben wird (Kuwana et al., 2002; Kuwana et al., 2005; Letai, 2009; Ren et al., 2010; Wei et al., 2000). Im Ergebnis oligomerisieren BAX und BAK und permeabilisieren dadurch die äußere Mitochondrienmembran, was wiederum zum Ausstrom von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt (Chipuk et al., 2010). Cytochrom c bildet darauf zusammen mit dem Adaptermolekül Apoptose-Protease-aktivierender Faktor-1 (APAF1) und Pro-Caspase 9 einen Apotosom benannten Komplex in dem die Caspase 9 aktiviert wird, welche dagegen die zentralen Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert (Abb. 1) (Chipuk und Green, 2008; Strasser, 2005).

In einem dritten Weg, der Bestandteil der „ungefalteten Protein Antwort“ (alias ER-Stress) ist und durch fehlgefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgelöst wird, kommt es ebenfalls zu einem caspasevermittelten Zelltod (Perez-Sala und Mollinedo, 1995). Dieser wird über die Caspase 12 vermittelt, welche am ER lokalisiert ist (Nakagawa et al., 2000; Nakagawa und Yuan, 2000). Diese aktiviert die Caspase 9, welche ihrerseits die Caspase 3 aktiviert. Des Weiteren kommt es zu einem Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER, der den mitochondrialen Signalweg der Apoptose aktiviert (Abb. 1) (Szegezdi et al., 2003).

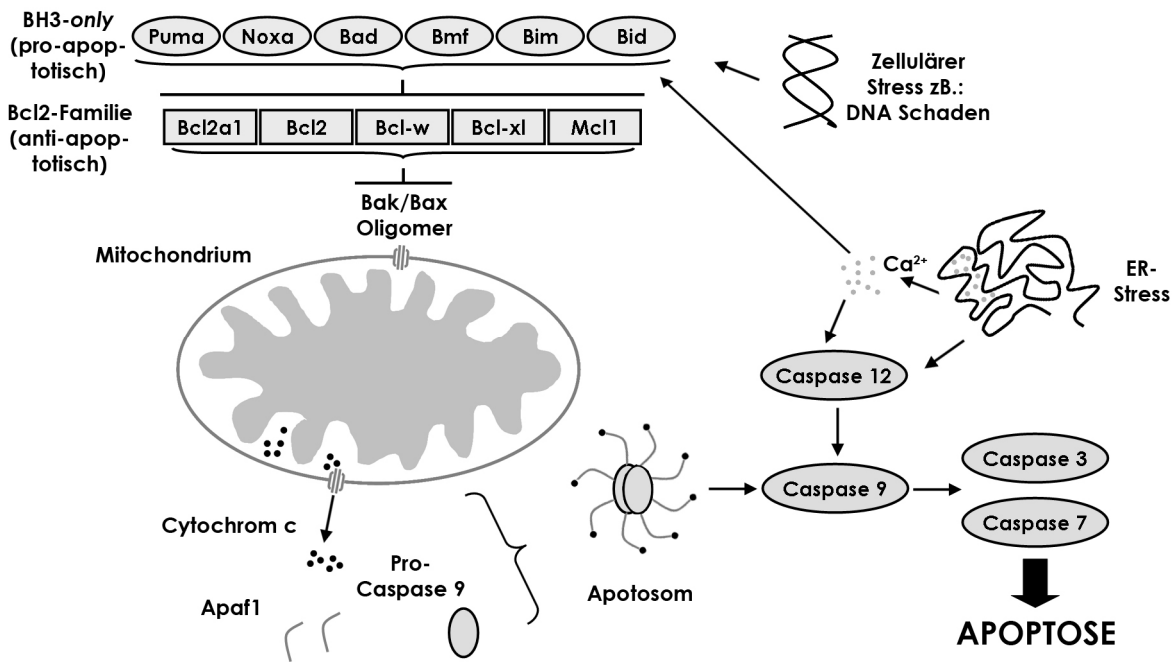


Abb. 1: Intrinsischer und ER-Stress Signalweg der Apoptose. Im intrinsischen Signalweg kommt es in Folge eines Stimulus (z.B.: DNA Schaden) zur Expression und Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen, darunter auch die pro-apoptotische BH3-only Proteine. Diese hemmen die anti-apoptotischen Bcl2-Proteine (indirekte Aktivierung von BAX und BAK) oder aktivieren die pro-apoptotischen Effektorproteine BAK und BAX direkt (nicht im Bild). Diese bilden daraufhin Homooligomere und permeabilisieren die äußere Mitochondrienmembran. Der resultierende Cytochrom c-Ausstrom führt zur Bildung des Apotosoms, in welchem die Pro-Caspase 9 zur Caspase 9 aktiviert wird. Caspase 9 aktiviert schließlich die zentralen Effektorcaspasen 3 und 7 und die Apoptose läuft unwiderruflich ab. Beim ER-Stress Signalweg kommt es auf Grund von falsch gefalteten Protein im ER zu einer Aktivierung von Caspase 12 und einem Ausstrom von Ca^{2+} . Die Caspase 12 (die ebenfalls durch den Ca^{2+} Überschuss bei Ca^{2+} -Ausstrom indirekt aktiviert wird) aktiviert die Pro-Caspase 9 in einem APAF1 unabhängigen Mechanismus. Was wiederum zur Aktivierung der zentralen Effektorcaspasen 3 und 7 und somit zur Apoptose führt. Durch den Ca^{2+} -Überschuss im Zytoplasma werden die Caspase 12 und das BH3-only Protein BID aktiviert. Durch die Aktivierung von BID kommt es mittelbar zum Ausstrom von Cytochrom c und ebenfalls zur Aktivierung der Pro-Caspase 9 und zur Aktivierung der zentralen Effektorcaspasen 3 und 7 (in Anlehnung an Elkholi et al., 2011 erweitert um Szegezdi et al 2003).

In einem Drittel von frühen MS-Läsionen werden Oligodendrozyten mit apoptotischer Morphologie gefunden (Lucchinetti et al., 1999). Die auf Apoptose hindeutenden morphologischen Befunde werden durch Ergebnisse gestützt, die zeigen, dass Oligodendrozyten in MS-Läsionen die apoptose-assoziierten Proteine BCL2, FAS und P53 exprimieren (D'Souza et al., 1996; Kuhlmann et al., 1999; Wosik et al., 2003).

1.5 Puma und Noxa

Die pro-apoptotischen BH3-only Proteine „P53 hochregulierter Modulator der Apoptose“ (PUMA, engl.: *P53 upregulated modulator of apoptosis*) und Noxa (lateinisch für Schaden) spielen Rollen im intrinsischen Signalweg der Apoptose. Beide wirken aktivierend auf die pro-apoptotischen Effektorproteine BAX und BAK. Die genaue Wirkungsweise der pro-apoptotischen BH3-only Proteine ist noch nicht bekannt, zurzeit werden sowohl eine teilweise direkte (Chipuk et al., 2010) wie auch eine strikt indirekte (Willis et al., 2007; Youle und Strasser, 2008) Aktivierung kontrovers diskutiert.

Das Gen *Puma* wurde 2001 das erste Mal beschrieben und kodiert für zwei Proteine: PUMA α und PUMA β , die ähnliche Eigenschaften haben und wie die anderen BH3-only Proteine als einzige Homologie zu den Bcl2-Proteinen eine α -helikale BH3-Domäne aufweisen. PUMA α ist ein 193 Aminosäuren großes und 21 kD schweres Protein dessen BH3-Domäne von den Aminosäuren 137-151 gebildet wird. PUMA β ist 131 Aminosäuren lang, die Aminosäuren 75-89 bilden die BH3-Domäne und das Molekulargewicht beträgt 14 kD. (Im Folgenden wird nicht mehr zwischen α und β unterschieden; beide haben ähnliche Eigenschaften wobei die α -Form häufiger vorkommt) (Han et al., 2001; Nakano und Vousden, 2001; Yu et al., 2001). Die BH3-Domäne dient als Bindestelle für seine Interaktionspartner der Bcl2-Familie, mit deren BH1-, BH2- und BH3-Domänen PUMA und die anderen Mitglieder der BH3-only Proteine interagieren (Sattler et al., 1997).

In Folge von Zellstress wie DNA-Schaden, Wachstumsfaktormangel oder ER-Stress kann die Expression von *Puma* sowohl über P53 (Nakano und Vousden, 2001) als auch über andere Transkriptionsfaktoren, wie E2F1 (Hershko und Ginsberg, 2004), *Forkhead box class 0 (FOXO) 3a* (You et al., 2006) und *CCAAT-enhancer binding proteins (C/Ebp) homologes Protein (Chop)* (Galehdar et al., 2010) vermittelt werden. Es kann die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine *Bcl-2 related Protein A1 (BCL2A1)*, *BCL2*, *BCL2-like 2 (BCL2L2 alias BCL-W)*, *Bcl2-like 1 (BCL2L1 alias BCL-XL)* und *myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl1)* binden und somit inhibieren (Abb. 2) (Chen et al., 2005; Chipuk und

Green, 2008; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002) und gehört somit zusammen mit BID und BIM zu den stärksten Vermittlern von Apoptose unter den BH3-only Proteinen. Eine direkte Aktivierung von BAX und BAK wird kontrovers diskutiert (Ren et al., 2010).

In vitro zeigen *Puma*defiziente (*Puma*^{-/-}) T-Lymphozyten eine hohe Toleranz gegenüber Etoposid- und γ -Strahlen vermitteltem genotoxischem Stress, dem Proteinase C-Aktivatortetradecanoyl-Phorbolacetat (PMA, engl.: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*) sowie dem Apoptoseinduktor Staurosporin (Villunger et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen wurden in *Puma*^{-/-} Neuronen und neuronalen Vorläuferzellen gemacht (Akhtar et al., 2006; Wytttenbach und Tolkovsky, 2006).

Puma^{-/-} Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp wie beispielsweise Entwicklungsstörungen (Villunger et al., 2003). In einem Tiermodell der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) tritt der Verlust der Motoneurone jedoch verspätet in *Puma*^{-/-} Mäusen auf (Kieran et al., 2007), zudem sind auch die Neuronen in einem Mausmodell der Epilepsie vor Zelltod geschützt (Engel et al., 2010a; Engel et al., 2010b). Überdies ist der Schaden am Myokard von *Puma*^{-/-} Mäusen nach einer Ischämie gegenüber Wildtyp Mäusen stark verringert (Toth et al., 2006).

NOXA ist ein 54 Aminosäuren (Mensch) bzw. 103 Aminosäuren (Maus) langes und 6 (Mensch) bzw. 12 (Maus) kD schweres Protein und wurde 1990 das erste Mal aus einer humanen adulten T-Zell-Leukämie cDNA Bank isoliert, beschrieben und zunächst *ATL-derived PMA-responsive gene* (APR) genannt (Hijikata et al., 1990). Später bekam es den Namen *PMA-induced protein 1* (PMAIP1), ehe ein Protein aus γ -bestrahlten embryonalen Mausfibroblasten isoliert wurde, welches NOXA (lateinisch für Schaden) genannt, der Gruppe der BH3-only Proteine zugeordnet und als putatives Homolog des humanen APR/PMAIP1 identifiziert wurde. Die BH3-Domäne wird im humanen NOXA von den Aminosäuren 29-77 gebildet. In der Maus weist NOXA sogar 2 BH3-Domänen auf, die von den Aminosäuren 27-35 und 78-86 gebildet werden. Wie in den anderen BH3-only Proteinen, vermitteln diese Domänen die Bin-

dung mit den Interaktionspartnern der Bcl2-Proteinfamilie (Oda et al., 2000). Humanes NOXA besitzt zudem eine Region, die zu der mitochondrialen Translokation notwendig ist und wird gebildet von den Aminosäuren 41-50 (Seo et al., 2003). Im murinen NOXA wird diese Region aufgrund ihrer Homologie für die Aminosäuren 90-99 postuliert.

Die Transkription von *Noxa* kann, wie die von *Puma*, durch P53 induziert werden (Oda et al., 2000). Aber auch eine hypoxieinduzierte, *hypoxia inducible factor 1 alpha* (Hif1 α)-abhängige, Hochregulation der *Noxa*expression ist bekannt (Kim et al., 2004). NOXA ist, dadurch dass es seine indirekte BAX und BAK aktivierende Fähigkeit scheinbar nur über das Binden von MCL1 vermittelt, das BH3-only Protein mit der geringsten pro-apoptotischen Wirksamkeit (Abb. 2) (Chen et al., 2005).

In vitro zeigen *Noxa*defiziente (*Noxa*^{-/-}) und gleichzeitig das Onkoprotogen E1A exprimierende embryonale Mausfibroblasten (MEFs) eine erhöhte Resistenz gegenüber den apoptotischen Stimuli Adriamycin, Etoposid und γ -Strahlung (Shibue et al., 2003).

Noxa^{-/-} Mäuse zeigen keine offensichtlichen Phänotypen in der Entwicklung und Tumorgenese (Shibue et al., 2003; Villunger et al., 2003). Mit γ -Strahlen behandelte *Noxa*^{-/-} Mäuse zeigen eine verringerte Anzahl an apoptotischen Epithelzellen in der Stammzellregion der Darmkrypten und ebenfalls in der *lamina propria* (Shibue et al., 2003).

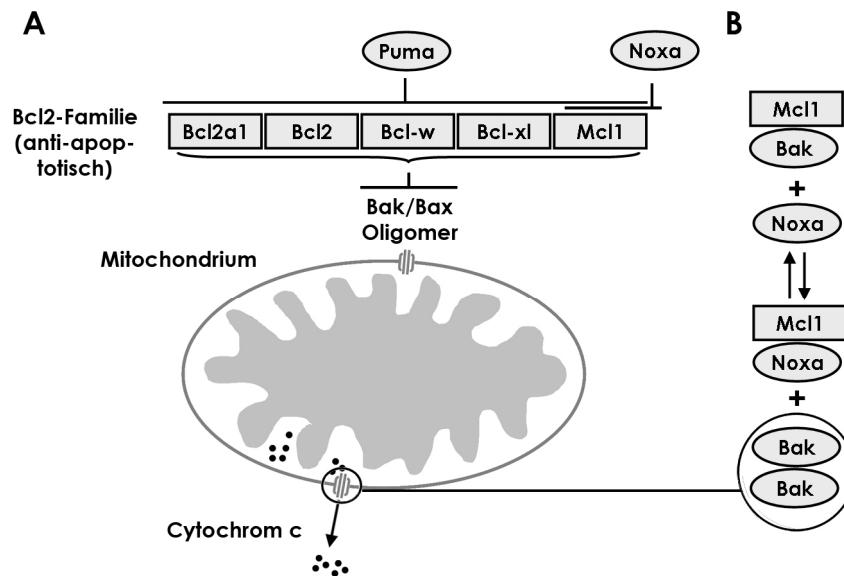


Abb. 2: Rolle der BH3-only Proteine PUMA und NOXA in der Apoptose. Sowohl PUMA als auch NOXA können Mitglieder der anti-apoptotischen Bcl2-Familie binden, die in Abwesenheit von BH3-only Proteinen BAX und BAK binden. NOXA kann nur MCL1 binden während Puma alle 5 Mitglieder binden kann (A). In Folge der kompetitiven Bindung der Proteine der anti-apoptotischen Bcl2-Familie zwischen den BH3-only Proteinen und BAX und BAK kommt es zu freien BAX und BAK Monomeren, die nun Homooligomere bilden können (hier exemplarisch für Noxa und Mcl1) (B).

1.6 TCF7L2 und HDACs

TCF7L2 ist ein Transkriptionsfaktor, der 1991 als erstes beschrieben und zunächst TCF-4 genannt wurde (Castrop et al., 1992). Als Transkriptionsfaktor kann er die Expression von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs unterdrücken oder aktivieren (Miller und Moon, 1996). Es wurde gezeigt, dass TCF7L2 einen Komplex mit den Histondeacetylasen (HDACs) 1 und/oder 2 bildet. HDAC1/2 konkurrieren mit β -Catenin um die Bindung mit TCF7L2. Bindet β -Catenin kommt es zur Transkription von Differenzierungsinhibitoren und die Differenzierung wird unterdrückt. Binden hingegen die HDAC(s) 1 und/oder 2 werden diese Inhibitoren nicht transkribiert und die oligodendrogliale Vorläuferzelle differenziert aus (Li und Richardson, 2009; Ye et al., 2009). In *Tcf7l2*-defizienten Mausembryonen ist im Gegensatz zu Wildtyp Embryonen 17,5 Tage nach Befruchtung noch keine Expression von *Mbp* und *Plp* festzustellen, der Beginn der Myelinisierung ist also gestört; die Tiere sterben kurz nach der Geburt (Ye et al., 2009). TCF7L2 wird ebenfalls während der Myelinisierung in der humanen Entwicklung sowie in MS-Läsionen von oligodendroglialen Zellen exprimiert (Fancy et al., 2009).

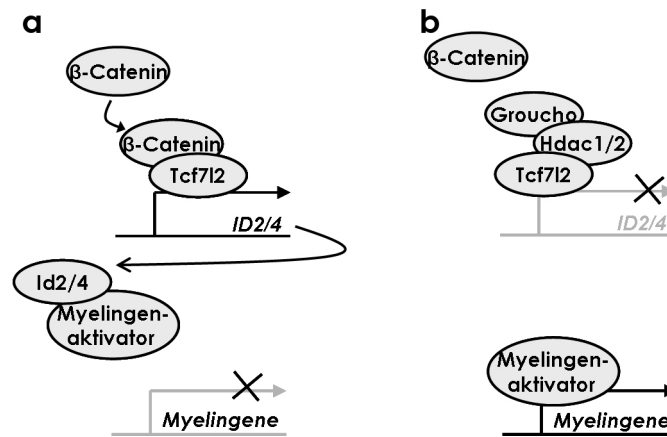


Abb. 3: Rolle von Hdac1/2, β -Catenin und TCF7L2 in der oligodendroglialen Differenzierung. In Abwesenheit der HDAC1 oder 2 bindet TCF7L2 durch den aktivierten kanonischen wnt-Signalweg nuklear lokalisiertes β -Catenin und es kommt zur Expression von Zielgenen wie z.B. *Id2* und *Id4*. *Id2* und *Id4* inhibieren Myelingenaktivatoren und es kommt nicht zur Differenzierung (a). Bildet TCF7L2 einen Komplex mit Groucho (alias TLE4) und HDAC1/2 ist die Transkription von *Id2/4* inhibiert. Der nicht mehr inhibierte Myelingenaktivator kann binden und es kommt zur Transkription der Myelingene und zur Differenzierung (b) (nach Li und Richardson, 2009).

HDACs sind zunächst als Enzyme charakterisiert worden, die Acetylgruppen von Lysinresten an Histonen des Chromatins entfernen. Sie sind somit die Gegenspieler der Histonacetylasen (HATs), die die Bindung von Acetylgruppen an Lysinreste der Histone katalysieren. Die Acetylierung der Histone dient zur Auflockerung des Chromatins, an Stellen, an denen Transkriptionsfaktoren an die DNA binden sollen, um eine Transkription zu ermöglichen (Strahl und Allis, 2000). Folglich verhindern HDACs durch die Deacetylierung die Transkription. Die Substrate der HDACs sind nicht alleine auf die Histone beschränkt. Sie interagieren auch mit Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel TCF7L2 (s.o.) und P53, Zytoskelettkomponenten und nukleären Hormonrezeptoren (Glozak et al., 2005; Spange et al., 2009). Die 18 bekannten HDACs werden anhand ihrer Struktur und Sequenzhomologien zu HDACs aus der Hefe in 4 Gruppen eingeteilt (Thiagalingam et al., 2003).

Klasse-I-HDACs sind hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und zeigt eine Homologie zu Rpd3, einer Hdac aus der Hefe. Zu dieser Klasse gehören die HDACs 1, 2, 3 und 8.

HDACs der Klasse II finden sich sowohl im Zytosol als auch im Kern und zeigen eine Homologie zu der aus der Hefe stammenden Hdac Hda1 und setzen sich

zusammen aus den HDACs 4 - 7, 9 und 10 (Khochbin et al., 2001; Wang und Yang, 2001).

Klasse III wird aus den sogenannten Sirtuinen (SIRT) 1-7 gebildet, die eine Homologie zu *silent information regulator 2* (Sir2) aus der Hefe zeigen und Nikotinamiddinukleotid (NAD) abhängig sind (Anekonda und Reddy, 2006; Finkel et al., 2009; Taylor et al., 2008a).

Die vierte Klasse besteht nur aus der HDAC11 und weist Sequenzhomologien mit den HDACs der Klasse I und II auf (Dietz und Casaccia, 2010; Gao et al., 2002).

HDACs sind in der Myelinisierung während der Entwicklung von großer Bedeutung. Ein konditionaler Knockout in Zellen oligodendroglialer Herkunft der HDACs 1 und 2 von Mäusen führt zu einem Versagen der Myelinisierung, weil keine Oligodendrozyten heranreifen. Ist jedoch nur eines der beiden Gene ausgeknockt findet eine Reifung der Oligodendrozyten statt und die Myelinisierung verläuft normal (Ye et al., 2009).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die C57Bl/6 wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen.

Die *Puma*^{-/-} und *Noxa*^{-/-} Mäuse wurden freundlicherweise von Professor Andreas Villunger zur Verfügung gestellt, der diese auch generiert und beschrieben hat. In den *Puma*^{-/-} Mäusen wurden durch homologe Rekombination die Exone 2 und 3 des *Puma*-Gens durch eine Neomycinkassette ersetzt. Die *Noxa*^{-/-} Mäuse wurden ebenfalls durch homologe Rekombination erzeugt, jedoch wurden hier die Exone 2 und 3 durch eine Hygromycinkassette ersetzt. Beide Mausstämme sind lebensfähig; ihre Entwicklung sowie die Histologie der Organe, einschließlich des adulten ZNS, weisen keine Unterschiede zu nicht Wildtypgeschwistertieren auf. (Villunger et al., 2003).

Die Verpaarungen wurden zwischen heterozygoten Tieren (*Puma*^{+/-}) durchgeführt, sodass es Ko(*Puma*^{-/-})- und Wildtyp(*Puma*^{+/+})-Geschwister gab. Die Versuche wurden mit adulten (8-14 Wochen) Geschwistertieren durchgeführt (s. Anhang). Während des Versuches wurden die Tiere in Gruppen von maximal vier Tieren in mit Staubhauben versehenen Käfigen mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

Die Haltung und Zucht erfolgte in der „Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung“ (ZTE) des Uniklinikums Münster. Der Tag-Nacht-Rhythmus lag bei zwölf Stunden. Pflege und Beobachtung der Tiere erfolgte durch Tierpfleger und –ärzte der ZTE und wissenschaftliche Mitarbeiter des Instituts für Neuropathologie.

Die Tierversuche wurden im Einklang mit §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) in Recklinghausen unter dem Aktenzeichen 8.87.-50.10.36.08.184 genehmigt.

2.1.2 Zelllinien

B104	Neuroblastom-Zellen aus Ratte
CG4	oligodendrogliale Vorläuferzelllinie aus Ratte (Louis et al., 1992)

2.1.3 Medien und Zusätze

CG4 Zellen

B104 Haltungsmedium

500 ml	DMEM (<i>high Glucose</i>)
50 ml	Fetales Kälberserum (FKS)
5 ml	Penicillin/Streptomycin (je 10 mg/ml)

N1-Medium

500 ml	DMEM (high Glucose)
5 ml	Penicillin/Streptomycin (je 10 mg/ml)
5 ml	N1 Medium Supplement (100X)

N1-Biotin-Medium

500 ml	DMEM (<i>high Glucose</i>)
5 ml	Penicillin/Streptomycin (je 10 mg/ml)
5 ml	N1 Medium Supplement (100X)
0,2 ml	Biotin (200 mg/ml)

CG4 Medium

70 ml	N1-Biotin-Medium
30 ml	B104 konditioniertes Medium

CG4 Einfriermedium

27 ml	CG4 Medium
3 ml	Dimethylsulfoxid (DMSO)

Primäre Mikroglia

Mikrogliaedium

50 ml	FKS
5 ml	nicht-essentielle Aminosäuren
5 ml	Penicillin/Streptomycin
5 ml	L-Glutamin

2.1.4 Oligonukleotide

Genotypisierung PCR Primer

Puma _{vorwärts}	AGG CTG TCC CTG GGG TCA TCC	$T_a = 59\text{ °C}$
Puma WT _{rückwärts}	GGA CTG TCG CGG GCT AGA CCC TCT	Produkt: ca. 200 bp
Puma KO _{rückwärts}	ACC GCG GGC TCC GAG TAG	$T_a = 59\text{ °C}$, Produkt: ca. 400 bp
Noxa _{vorwärts}	GGA GGG CAT AAA TGG GCA ATG ACA C	$T_a = 57\text{ °C}$, Produkt: ca. 200 bp
Noxa WT _{rückwärts}	GAT GCT TCT TGG GTG CAC CCA CAC	
Noxa KO _{rückwärts}	AAA GCA ATC CCA AAC GAC	$T_a = 57\text{ °C}$, Produkt: ca. 200 bp

qRT-PCR Primer

hARP _{vorwärts}	CGA CCT GGA AGT CCA ACT AC	$T_a = 55 - 61\text{ °C}$, Produkt: 109 bp
hARP _{rückwärts}	ATC TGC TGC ATC TGC TTG	
rPuma _{vorwärts}	ATA CTG GAC TGC CAG CCT TG	$T_a = 62\text{ °C}$, Produkt: 154 bp
rPuma _{rückwärts}	CTC GGT CAC CAT GAG TCC TT	
mPuma _{vorwärts}	GCA GTA CGA GCG GCG GAG AC	$T_a = 60\text{ °C}$, Produkt: 204 bp
mPuma _{rückwärts}	GCC AGG GTG TCA GAA GGC GG	
rNoxa _{vorwärts}	GCA GCT CAG CTC AGG AAG AT	$T_a = 55\text{ °C}$, Produkt: 186 bp
rNoxa _{rückwärts}	GTC TCC AAT TCT CCG CAG TT	

mNoxa _{vorwärts}	GTT CGC AGC TCA ACT CAG GAA G	T _a = 55 °C,
mNoxa _{rückwärts}	GAA GTT TCT GCC GTA AAT TCA C	Produkt: 209 bp
MAG _{vorwärts}	ACC GCC TTC AAC CTG TCT GT	T _a = 55 °C,
MAG _{rückwärts}	CTC GTT CAC AGT CAC GTT GC	Produkt: 159 bp
MBP _{vorwärts}	AAG AAC ATT GTG ACA CCT CGA A	T _a = 55 °C,
MBP _{rückwärts}	CTC TTC CTC CCA GCT TAA AGA T	Produkt: 178 bp
PLP _{vorwärts}	CAA GAC CTC TGC CAG TAT AG	T _a = 55 °C,
PLP _{rückwärts}	AGA TCA GAA CTT GGT GCC TC	Produkt: 265 bp

2.1.5 Geräte

2100 Bioanalyser Pico-Assay	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Ausgießstation Leica EG 1150H	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Autoklav HIClave HV-85	HMC Tüßling
Autostainer Link 48	DaKo, Glostrup, Dänemark
Binokular	Eschenbach, Nürnberg
DNA Microarray Scanner	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DNA-Gelapparatur Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, Hercules, USA
Einbettautomat Tissue Tek VIP	Sakura Finetek, Alphen an den Rijn, Niederlande
Feinwaage BP211 D	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskope (IX50 und IX71)	Olympus, Hamburg
Geldokumentation Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator	Ultraviolet Products, Upland, USA
Gitterokular WH10X-H/22	Olympus, Hamburg
Heizrührer Combimag RCO	IKA Labortechnik, Staufen

Lasermikrodissektionsgerät Mikroskop IX71, Cell Cut	Olympus, Hamburg; MMI, Glattburg, CH
Mastercycler Pro Vapo.protect	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop BX41 und CK30	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten-Lesegerät Multiskan EX	Labsystems, Solon, USA
Mikrotom	Reichert-Jung, Depew, USA
Multipette® Plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik, Friedrichsdorf
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pipettierhilfe Accu-jet pro®	Brand, Wertheim
Reagenzglasschüttler, Vortexer	VWR International, Darmstadt
Reinstwasseranlage MilliQ	Millipore, Billerica, USA
Research Pipetten (2,5, 10, 20, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Rotor-Stator Homogenisator Ultra Turax® T8	IKA Labortechnik, Staufen
Schüttler KS 130 basic	IKA Labortechnik
SDS-Gelapparatur Hoefer™ SE 260	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Spannungsquelle Power Pac 3000	Bio-Rad, Hercules, USA
Spectrophotometer Nano-Drop 1000	Peqlab, Erlangen
StepOnePlus™ Realtime-PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Steril Bank Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Sprout	Kisker Biotech, Steinfurt
Trockenschrank	Memmert, Schwabach

UV-Einheit U-RFL-T	Olympus, Hamburg
Vakuumentrifuge Concentrator Plus	Eppendorf, Hamburg
Waage FA 3100-2iCE	Faust, Schaffhausen, CH
Wasserbad	Fisherbrand, Schwerte
Zellkulturinkubator Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Wertheim
Zentrifuge Megafuge	Heraeus, Wertheim
Zentrifuge Sigma GK15	Sigma, Osterode am Harz

2.1.6 Verbrauchsmittel

4x44k Design Array	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
96er well Platten	Nunc, Rochester, USA
Altromin 1321, Kleinnagerfutter	Altromin Spezialfutter, Lage
Combitips, 1ml, 5ml	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen	Engelbrecht, Edermühle
Einbettungskassetten	Engelbrecht, Edermünde
Kanülen „Sterican“	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc, Rochester, USA
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Objektträger Super Frost®	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipetten Costar Stridette (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, Corning, USA

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 15 ml, 50 ml	Corning, Corning, USA
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Spritzen „Discardit“	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Zellkultur Mikropplatten Cellstar	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur Multiwell Platten (6er, 12er, 24er, 48er)	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen Cellstar	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.7 Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen

1 kb DNA Marker	Promega, Madison, USA
100bp DNA Marker	Promega, Madison, USA
10X EBSS (Zellkultur)	Sigma-Aldrich, München
5X GoTaq Puffer	Promega, Madison, USA
cDNA Spike-in Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DepEx mounting Medium	Serva, Heidelberg
DMEM (High glucose)	PAA, Paschin Österreich
Eukitt	Kindler, Freiburg
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

ImmuMount	Thermo Scientific (Shandon), Pittsburgh, USA
Low RNA Input linear Amplification Kit Plus, one-color	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
microRNA Kit	Qiagen, Hilden
nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
PBS (Zellkultur)	PAA, Paschin, Österreich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin-Glutamat (PSG)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Power Sybr® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
RNasefree DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Trace Elements B	Cellgro, Manassas, USA

2.1.8 Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniak	Merck, Darmstadt
Apotransferrin	Sigma-Aldrich, München
Aqua purificata	Roth, Karlsruhe
B27 Supplement	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bicine	Sigma-Aldrich, München
Biotase	Biochrom, Berlin
Biotin	Sigma-Aldrich, München
BisTris	Serva Electrophoresis, Heidelberg

Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
BSA (Zellkultur)	Sigma-Aldrich, München
Chlorobutanol	Merck, Darmstadt
Citrat	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Darmstadt
Cuprizon (Bis-Cyclohexanon-Oxaldihydrazone)	Sigma-Aldrich, München
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DNase f. Zellkultur	CellSystems, Troisdorf
Eosinlösung	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München
Extravidin Peroxidase (POX)	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Forskolin	Sigma-Aldrich, München

Genificin (G418)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glukose	Sigma-Aldrich, München
Hämalaun/Hämatoxylin nach Mayer	Merck, Darmstadt
Insulin	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol/2-Propanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Ketamin (10%)	Ceva, Düsseldorf
L-Cystein Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Leukozeptin	Sigma-Aldrich, München
LFB	BDM Laboratory Supplies, Pool, GB
Lithiumcarbonat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Mausfutter	Altromin, Lage
Methanol	Merck, Darmstadt
N1-Supplement	Sigma-Aldrich, München
N-acetyl-cystein	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, München
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, München
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Ovomucoid Trypsin Inhibitor	CellSystems, Troisdorf
Papain	CellSystems, Troisdorf
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Periodsäure	Merck, Darmstadt
Peroxinitrit (ONOO)	Sigma-Aldrich, München

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES)	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, München
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, München
Progesteron	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Proteinaseinhibitorcocktailtabletten Complete®	Roche, Mannheim
Putrescin (1,4 Diaminobutan)	Sigma-Aldrich, München
Rekombinantes NT3	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes PDGF-AA	PeptoTech, Hamburg
Salpetersäure (HNO ₃)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl), 1M	Merck, Darmstadt
Schiff's Reagenz	Sigma-Aldrich, München
S-Nitroso-N-Acetylpenicilinamin (SNAP)	Sigma-Aldrich, München
Staurosporin	Sigma-Aldrich, München
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/EDTA (10X)	PAA, Paschin, Österreich
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt

Xylazin (2 %)	Ceva, Düsseldorf
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
β-Mercapthoethanol	Sigma-Aldrich, München

2.1.9 Antikörper

Primärantikörper

Immunhistochemie

Kaninchen anti-CPP32, polyklonal	BD, Pharmingen, Franklin Lakes, USA	1:100, MW Tris-EDTA
Kaninchen anti-GFAP, polyklonal	DaKo, Glostrup, Dä- nemark	1:1.000, keine Vorbehand- lung
Kaninchen anti-HDAC2, polyklonal	Santa Cruz Biotech- nologies, Santa Cruz, USA	1:200, Dampfgarer Citrat
Kaninchen anti-MBP, po- lyklonal	DaKo, Glostrup, Dä- nemark	1:2.000, MW Citrat
Kaninchen anti-NG2	Chemicon	1:200, MW Citrat
Kaninchen anti-NOGO-A	Millipore, Billerica, USA	1:100, MW Tris-EDTA
Kaninchen anti-OLIG2, monoklonal	IBL, Spring Lake Park, USA	1:150, Autostainer Tris pH 6,1
Kaninchen anti-Puma, polyklonal	Abcam, Cambridge, Groß- britannien	1:200, MW Citrat
Kaninchen anti-TCF7L2, monoklonal	Cell Signaling, Bos- ton, USA	1:100. Dampfgarer Citrat
Maus anti-GFAP, monoklonal (Klon: G-A-5)	Sigma-Aldrich, München	1:500, Dampfgarer Citrat

Maus anti-NOGO-A, monoklonal, Klon 11c7	Prof. M. Schwab, Institut für Hirnforschung, Universität Zürich, Schweiz	1:10.000, MW Citrat
Maus anti-TCF7L2, monoklonal	Abnova, Jhongli City, Taiwan	1:300, MW Citrat
Maus anti- β -Catenin, monoklonal	BD Transduction Laboratories, Lexington, USA	1:300, Dampfgerar Citrat
Ratte anti-Mac3, monoklonal	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA	1:200, MW Citrat
Ratte anti-Maus-Ki-67, monoklonal (Klon: Tec3)	Dako, Glostrup, Dänemark	1:20, Dampfgerar, Citrat

Sekundärantikörper

Immunhistochemie

Kaninchen anti-Ratte biotinyliert	Dako, Glostrup, Dänemark
Schaf anti-Maus biotinyliert	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Ziege anti Kaninchen biotinyliert	Vector Lineris, Burlingame, USA
Ziege anti-Kaninchen AP-konjugiert	Dako, Glostrup, Dänemark
Ziege anti-Maus AP-konjugiert	Dako, Glostrup, Dänemark
Ziege anti-Maus biotinyliert	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
Ziege anti-Ratte biotinyliert	Amersham Bioscience Europe, Freiburg

2.1.10 Puffer und Lösungen

Citrat-Puffer

2,1 g	Zitronensäure-Monohydrat (10 mM)
ad 1 l	Aqua bidest.
pH	6,0

DNA-Lysispuffer

10 ml	2 M Tris, pH 8,5
20 ml	50 mM EDTA, pH 7,0
2 ml	20 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
8 ml	5 M NaCl
ad 200 ml	Aqua bidest.

Paraformaldehyd-Lösung

4 g	Paraformaldehyd
8 g	NaCl
1,15 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
ad 1 l	Aqua bidest.
pH	7,4

PBS-Puffer (20X)

160 g	NaCl
23 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
4 g	KCl
4 g	KH ₂ PO ₄
ad 1 l	Aqua bidest.

TAE-Puffer (50X)

242 g	Tris
100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
57,1 ml	Essigsäure
ad 1 l	Aqua bidest.

TBS-Puffer (20X)

48,4 g	Tris
160 g	NaCl
ad 1 l	Aqua bidest.
pH	7,6

TBS-T-Puffer

1 g	Tween 20
ad 1 l	TBS-Puffer

Tris/EDTA-Puffer

1,21 g (10 mM)	Tris
0,29 g (1 mM)	EDTA
pH	9,0
ad 1 l	Aqua bidest.

Eosin-Lösung

1 g	Eosin
20 ml	Aqua bidest.
80 ml	96 % Ethanol

Luxol-Fast-Blue-Lösung

1 g	Luxol-Fast-Blue
5 ml	10 % Essigsäure
100 ml	96 % Ethanol

Mowiol

12 g	Mowiol
30 g	Glycin
30 ml	Aqua bidest.
60 ml	0,2 M Tris, pH 8,5

DAB-Entwicklungslösung

1 ml	DAB-Stocklösung
20 µl	30 %iges H ₂ O ₂
ad 50 ml	PBS

DAB-Stocklösung

25 mg	DAB
1 ml	PBS

NBT/BCIP Entwicklungslösung

225 µl	NBT-Stocklösung
175 µl	BCIP-Stocklösung
ad 50 ml	NBT/BCIP-Puffer

NBT-Stocklösung

100 mg	NBT
1 ml	70 % DMF

BCIP-Stocklösung

50 mg	BCIP
1 ml	DMF

NBT/BCIP-Puffer

12,1 g	Tris
10,2 g	MgCl ₂
5,6 g	NaCl

AEC-Entwicklungslösung

16 mg (frisch gelöst in 4 ml DMF)	AEC
40 µl	30 % H ₂ O ₂
ad 50 ml	Acetatpuffer

Acetat-Puffer

210 ml	0,1 M Essigsäure
790 ml	0,1 M Na-Acetat
pH	5,2

2.1.11 Software

GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
StepOne Software	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

2.2 Methoden**2.2.1 Isolierung und Amplifikation von Nukleinsäuren****Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen und Ohrstanzen**

Zu der Schwanzspitze bzw. der Ohrstanze wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 200 µl DNA-Lysispuffer gegeben und diese für 2 h bei 55 °C und 1200 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden darauf folgend 200 µl 2-Propanol zugegeben und auf dem Vortexer kurz vermischt. In der Tischzentrifuge wurde die DNA für 30 min bei 5000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das DNA Pellet mittels 70 %igen eiskaltem Ethanol gewaschen. Nachdem der Ethanol dekantiert und das Pellet kurz bei 55 °C im Thermomixer getrocknet wurde, wurde die DNA in 100 µl Aqua purificata für 1 h bei 55 °C gelöst.

RNA-Isolierung aus Gewebe

Zur RNA-Isolierung wurde das „RNeasy Mini Kit“ genutzt. Das Gewebestück wurde hierzu in 600 µl RLT Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol aufgenommen

und im Rotor-Stator Homogenisator aufgeschlossen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten in Übereinstimmung mit den Angaben des Herstellers und einem zusätzlichem DNA-Verdau bei dem das „RNasefree DNase Set“ zum Einsatz kam. Die Elution erfolgte in 30 µl RNasefreiem Wasser.

RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen

Die RNA-Isolierung aus Zellen erfolgte analog zu der aus Gewebe mit der Abweichung, dass die Zellen direkt in der Kulturschale durch Zugabe von 300 bzw. 600 µl RLT Puffer je nach Größe der Kulturschale mit 1 % β-Mercaptoethanol lysiert wurden. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Von hier an wurde das gleiche Protokoll wie bei der RNA-Isolierung aus Gewebe genutzt.

2.2.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen wurde das UV/Vis-Spektralphotometer „Nano-Drop 1000“ genutzt. Hierzu wurden 1,5 µl Probe auf das Messpodest pipettiert und nach Absenken des Messarms die Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ gemessen. Die RNA-Konzentration wurde mittels der Formel $c(\text{RNA}) = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 40 \text{ µg/µl}$ bestimmt.

2.2.3 Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription, also der Synthese von cDNA aus RNA, wurde das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ eingesetzt. Es wurde zunächst ein Mastermix mit den folgenden Komponentenmengen und einer Pipettierreserve von 10 % pro Reaktion zusammenpipettiert:

10X RT-Puffer	2 µl
25X dNTP Mix	0,8 µl
10X RT-Random Primer	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1 µl
RNA (50 – 1000 ng)	x µl
Aqua purificata	ad 20µl

Die eingesetzte RNA-Menge richtete sich nach der geringsten Konzentration der zuvor erfolgten Präparation, sodass in allen gleichzeitig durchgeführten Reaktionen die gleiche Menge RNA eingesetzt wurde. Die eingesetzten Mengen lagen stets zwischen 50 und 1000 ng. Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturverlauf durchgeführt:

25 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	5 min
4 °C	∞

Die erhaltene cDNA wurde 1:10 in rnasefreiem Wasser verdünnt und aliquotiert. Nicht direkt benötigte cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für jede konventionelle PCR wurde ein Mastermix pipettiert, der sich aus den unten angegebenen Komponentenmengen pro Reaktion und einer Pipettierreserve von 10 % zusammensetzte:

5X Gotaq-Puffer	4 μ l
dNTPs (10mM)	0,4 μ l
GoTaq-Polymerase	0,1 μ l
Primer 1	0,5 μ l
Primer 2	0,5 μ l
Aqua purificata	ad 19 μ l

Bei jeder Analyse wurden eine Wasserkontrolle, eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Es wurde pro Reaktion 19 μ l Mastermix in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt, mit 1 μ l DNA-Probe versehen und herunterzentrifugiert. Die PCR wurde im Thermocycler unter Verwendung des folgenden Standardprogramms durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 s	
Primerhybridisierung	T _A	15 s	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

2.2.5 Quantitative Realtime-PCR

Zur Bestimmung relativer Expressionslevel von Zielgenen kam die quantitative Realtime-PCR zum Einsatz. Als Fluorochrom wurde SYBR® Green benutzt und die relativen Expressionslevel der Zielgene wurden mittels der $\Delta\Delta C_t$ Methode bestimmt (Livak und Schmittgen, 2001). Die Primer wurden so gewählt, dass sie über die Exon-Exon-Grenzen reichten und somit eine Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen wurde. Es wurde für jedes Zielgen ein Mastermix pipettiert, der sich aus den unten angegebenen Komponentenmengen pro Reaktion und einer Pipettierreserve von 10 % zusammensetzte:

Power SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl
Primer 1 (10 mM)	0,14 µl
Primer 2 (10 mM)	0,14 µl
Aqua purificata	ad 19 µl

Pro zu untersuchender cDNA-Probe und Zielgen wurden drei Reaktionen angesetzt. Als endogene Kontrolle wurde das saure ribosomale Protein (HARP, *human acidic ribosomal protein*, alias RPLP0 *ribosomal protein, large, p0*) genutzt. Es wurden pro Reaktion 19 µl des jeweiligen Mastermixes in den Vertiefungen einer „MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate“ vorgelegt. Nach kompletter Präparation der Platte wurde jeweils 1 µl Probe zu den vorgelegten Reaktionsgemischen gegeben. Nach Versiegelung der Platte mit „MicroAmp® Optical Adhesive Film“ wurde diese 1 min bei 2000 x g zentrifugiert. Die Reaktion erfolgte im StepOnePlus Real-Time PCR System mit dem folgenden Standardprogramm:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 s	
Primerhybridisierung	T _A	15 s	
Elongation	72 °C	1 min	

Im Anschluss an die Reaktion erfolgte stets eine Schmelzkurvenanalyse, um die Spezifität der Primer nachzuweisen. Die C_T-Werte wurden mit dem Programm StepOne Software bestimmt. Zur Bestimmung der relativen Expressionslevel wurden die C_T-Werte zunächst auf den Mittelwert der endogenen Kontrolle normiert (ΔC_T -Wert). Die jeweiligen $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden mit dem Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (unbehandelt, Kontrolltiere, WT, etc) gebildet, aus denen sich nach der Formel

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

die relative Expression berechnet.

2.2.6 Mikroarray

Zur Identifikation von Kandidatengenomen wurde die Mikroarraytechnologie eingesetzt. Die benötigte RNA wurde aus den *Corpora callosa* von für 6, 10 und 21 Tage mit Cuprizin behandelten Mäusen isoliert. Die RNA-Isolierung erfolgte abweichend zum Standardprotokoll mit dem „microRNA Kit“ und einer darauf folgenden Behandlung mit DNaseI zur Eliminierung eventueller Kontaminationen mit genomischer DNA. Die RNA-Konzentration und -Qualität wurde mittels Bioanalyzer 2100 bestimmt. Für die cDNA Synthese wurden 200 ng RNA eingesetzt. Bei der cDNA Synthese kam aufgrund der geringen RNA Mengen das „Low RNA Input linear Amplification Kit Plus, one-color“ zum Einsatz. Die Hybridisierung auf dem „4x44k Whole Mouse Genome Chip“ erfolgte für 17 h bei 65 °C und 10 rpm im Hybridisierungssofen. Die anschließende Auswertung wurde im DNA-Microarray Scanner durchgeführt, der die Intensität des an die cDNA gekoppelten Farbstoffs Cyanin 3 als Maß für die Genexpression mit einer Auflösung von 5 µm bestimmte. Die Kalibrierung des Fluoreszenzsignals erfolgte durch die Hybridisierung von cDNA aus dem Agilent cDNA Spike-in Kit.

Die statistische Auswertung der Mikroarraydaten erfolgte in Kooperation mit Prof. Brunner von der Abteilung für medizinische Statistik der Universität Göttingen.

2.2.7 Agarose Gelelektrophorese

Die Analyse amplifizierter DNA-Fragmenten aus konventionellen PCRs erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde die Konzentration des Gels gewählt - in der Standardanwendung betrug diese 1,5 %. Es wurden hierfür 1,5 g Agarose eingewogen und in 100 ml TAE Puffer in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgekocht. Zur aufgekochten Agaroselösung wurden 3 µl Ethidiumbromidlösung (EtBr) (10 mg/ml) gegeben und durch Schwenken vermischt. Die Lösung wurde in Gelschlitten mit zwei 20er Kämmen mit einer Stärke von 0,75 mm gegeben. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es auf dem Schlitten in die Elektrophoreseapparatur mit TAE Puffer gegeben und 10 µl PCR-Produkt pro

Tasche aufgetragen. Als Größenstandard wurde entweder der 100 bp oder 1 kb Marker einmal pro Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120 V über 20 min. Nach erfolgter Trennung wurde das Gel mit einer UV-Geldokumentationsapparatur fotografiert und ausgewertet.

2.2.8 Kultivierung von Zelllinien

Die oligodendrogliale CG-4 Zelllinie entstand durch eine spontane Immortalisierung einer Primärkultur von glialen Vorläuferzellen aus Gehirnen von 1 – 3 Tage alten Ratten. Die Zellen dieser Zelllinie zeigen die Eigenschaften von oligodendroglialen Vorläuferzellen und wurden auch als solche charakterisiert (Louis et al., 1992).

Die Kultivierung erfolgte in mit Poly-L-Ornithin beschichteten Kulturgefäßen, in CG-4-Medium, bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellkulturinkubator. Die Kultur wurde stets unterhalb von ca. 70 % Konfluenz geführt. Zur Beschichtung wurden die Kulturgefäße über Nacht mit 0,002 % wässriger Poly-L-Ornithin Lösung beschichtet und anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit Biotase benetzt und für ca. 5 min im Zellkulturinkubator inkubiert. Durch Schütteln und Klopfen wurden die Zellen abgelöst, in CG-4-Medium suspendiert, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 5 ml CG-4 Medium resuspendiert und je nach gewünschter Anwendung ausgesät.

2.2.9 Präparation und Kultivierung von primären murinen Mikroglia

In einer Kooperation mit Dres. Luisa Klotz und Stephanie Hucke von der Klinik für Neurologie der Uniklinik Münster wurden Mikroglia aus Mäusen präpariert und kultiviert. Präparation, Kultivierung sowie Aktivierung und RNA Extraktion (s. unten) der Mikroglia wurden in der Klinik für Neurologie von Dr. Stephanie Hucke durchgeführt. Die Analyse der Expressionslevel mittels qRT-PCR erfolgte am Institut für Neuropathologie.

Die Extraktion der Mikroglia wurde wie folgt durchgeführt. 5 Tage alte Mäuse wurden dekapitiert und das Großhirn herauspräpariert. Die Hirnhäute wurden

entfernt, das Hirn in 5 ml eiskaltes PBS überführt und durch Auf- und Abpipetieren homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 5 min auf Eis gelagert, so dass sich größere Gewebestücke absetzen konnten. Der Überstand wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 486 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Mikroglia-medium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Poly-L-Lysin beschichtete Flasche gegeben und im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Weitere Mediumwechsel erfolgten wenn nötig. Nach 14 Tagen konnten von der Mischkultur die ersten Mikroglia durch Abschlagen geerntet werden.

2.2.10 Aktivierung von murinen Mikroglia *in vitro*

Es wurden $2,5 \times 10^5$ Mikroglia je 6er Kulturschalenvertiefung ausgesät und für 6 h mit 5 ng/ml Lipopolisaccharid und 1 pg/ml IFN γ stimuliert. Nachfolgend wurde die RNA extrahiert und mittels qRT-PCR analysiert.

2.2.11 Kryokonservierung

Alle primären Zellen und Zelllinien wurden in ihrem Kultivierungsmedium mit 10 % DMSO bei -80 °C für kurzzeitige Lagerung und bei -196 °C (N $_2$, flüssig) für Langzeitlagerung eingefroren.

2.2.12 Zelltod und Proliferations-Tests

MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein colorimetrischer Assay mit dessen Hilfe die relative metabolische Aktivität bestimmt werden kann. Er beruht darauf, dass ein Tetrazolium-Salz, das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), in der Zelle zu Formazan zersetzt wird. Dies geschieht größtenteils durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums, das als Kofaktor benötigte NAD(P)H wird durch die Glykolyse bereitgestellt (Berridge und Tan, 1993). Das Formazan wird spektroskopisch quantifiziert und korreliert direkt mit der metabolischen Aktivität der Zellen.

Für einen MTT-Assay wurden jeweils gleiche Zellzahlen in 24er Multiwellplatten ausplattiert (CG-4: $3,0 \times 10^4$, OPCs: $2,5 \times 10^4$). Nach 24 h (CG-4) bzw. 12 h

(OPCs) erfolgte ggf. die Stimulation. Zur Auswertung wurde für 1 h mit 0,5 mg/ml MTT versetztes Medium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit jeweils 200 µl 2-Propanol aufgeschlossen und 5 min auf dem Schüttler bei 400 rpm inkubiert. Die Zelllysate wurden in eine 96er Multiwellplatte überführt und im ELISA-Leser die Absorption der Lysate bei $\lambda = 570$ nm gemessen. Von jedem Zelllysate wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, also je Probe zweimal 80 µl in zwei 96er Vertiefungen überführt. Die Absorptionen wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert und die statistische Analyse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism. Es wurde für alle Bedingungen technische Replikate durchgeführt und die Versuche mindestens dreimal wiederholt.

2.2.13 Tierexperimentelle Methoden

Cuprizongabe

Die Mäuse erhielten für 4, 6, 10, 21 oder 42 Tage gemahlene Futter *ad libitum*, das mit Cuprizon vermischt worden ist (0,1 oder 0,3 %). Das Gewicht der Tiere wurde zweimal pro Woche, der neurologische Zustand werktäglich überprüft. Eine Abmagerung der Tiere erfolgte bei der geringen Konzentration (0,1 %) an Cuprizon nicht. Der Allgemeinzustand war stets sehr gut.

Transkardiale Perfusion und Präparation für Paraffinschnitte

Nachdem den Mäusen eine lethale Dosis Xylazin/Ketamin *intra peritoneal* (i.p.) injiziert wurde, wurde abgewartet bis keine Schmerzreflexe zu beobachten waren und Schnappatmung einsetzte. Die Maus wurde dann fixiert und auf die folgende Weise mit PBS und PFA transkardial perfundiert: Der Brustkorb wurde geöffnet und 10 ml PBS in die linke Herzkammer injiziert, während gleichzeitig der rechte Vorhof geöffnet wurde. Im Anschluss wurden 10 ml 4 %iges Paraformaldehyd (PFA) auf dieselbe Weise appliziert. Nach erfolgter Perfusion wurden Proben von Milz und Leber entnommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 15 ml 4 %igem PFA gegeben. Danach wurde der Schädel geöffnet und mitsamt dem Gehirn ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Wirbelsäule wurde direkt oberhalb des Beckens und in der Mitte der Brustwirbelsäule durchtrennt. Das Rückenmark wurde dann mittels einer

Durchspülung des Wirbelkanals mit PBS herauspräpariert. Dies erfolgte mittels einer 5 ml Spritze mit Luer-Lock und einer 21G-Kanüle, die in den Wirbelkanal am proximalen Ende der Wirbelsäule eingeführt wurde. Das Rückenmark wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben.

Die Präparate wurden über Nacht bei 4 °C fixiert. Am folgenden Tag wurde das PFA gegen PBS ausgetauscht und die Präparate erneut über Nacht bei 4 °C gelagert. Vor der Entwässerung erfolgte der Zuschnitt der fixierten Präparate. Leber und Milz wurden passend für die Einbettkassette zugeschnitten, das Rückenmark in 3 – 5 mm lange Querschnitte lamelliert und das Hirn nach erfolgter Präparation aus dem Schädel in Höhe des *Chiasma opticum* und vor dem *Cerebellum* koronal durchtrennt. Die fixierten und zugeschnittenen Gewebestücke wurden in Einbettkassetten gegeben. Die Einbettkassetten wurden für 30 min fließend gewässert, anschließend für 30 min in 50 % Ethanol und dann in 70 % Ethanol äquilibriert. Nach erfolgter Entwässerung im Einbettautomaten Tissue Tek VIP, wurden die Gewebestücke mit der Schnittfläche zur späteren Anschneidefläche gewandt an der Ausgießstation in Paraffin gegossen.

Transkardiale Perfusion und RNA-Präparation aus dem *Corpus callosum*

Den Mäusen wurde eine lethale Dosis Xylazin/Ketamin i.p. appliziert. Nachdem keine Schmerzreflexe mehr zu beobachten waren und Schnappatmung einsetzte, wurden sie fixiert und wie oben beschrieben mit PBS transkardial perfundiert. Unmittelbar danach wurde das Gehirn entnommen und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Präparation der *Corpora callosa* erfolgte später unter einem Binokular. Die RNA Extraktion aus den präparierten *Corpora callosa* erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

2.2.14 Histologische Techniken

Paraffinschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Gewebestücke wurden mit dem Mikrotom in 3 µm dünne Schnitte geschnitten und diese auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden vor jeder Färbetechnik entparaffiniert. Dies geschah durch zweimaliges zehnminütiges inkubieren in Xylol. Darauf folgend wurden

die Schnitte durch je zweiminütige Inkubation in einer fallenden Ethanolreihe: 99 % → 99 % → 96 % → 96 % → 70% → Aqua bidest. rehydriert.

Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate in einer steigenden Ethanolreihe analog zur Rehydrierung dehydriert und nach zweimaliger zehninütiger Inkubation in Xylol mit „DepEx Mounting Medium“ eingedeckelt. Bei durchgeführten Doppelfärbungen wurden die Präparate auf Grund der Löslichkeit der Farbstoffe direkt nach der Umpufferung in Aqua bidest. mit dem wasserbasierten Einbettmedium „Immu Mount“ eingebettet.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei dieser Färbemethode werden die sauren Strukturen in der Zelle, vor allem Kern und raues endoplasmatisches Retikulum, durch das in Hämalan umgewandelte Hämatoxylin blau angefärbt. Die basischen Anteile, also das Zytoplasma der Zelle, werden mit Eosin rot bis rosa angefärbt.

Zunächst erfolgte die Färbung der Zellkerne, in dem die Schnitte aus Aqua bidest. genommen und für 5 min in Hämalan-Lösung nach Mayer getaucht wurde. Das Bläuen erfolgte für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Die Schnitte wurden kurz in Aqua bidest. gespült und anschließend für 5 min in Eosin-Lösung gestellt. Die Rehydrierung erfolgte wie oben beschrieben (s. Paraffinschnitte).

Luxol-Fast-Blue/ Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (LFB-PAS-Färbung)

Bei der LFB-PAS-Färbung wird das Myelin durch das Luxol-Fast-Blue blau angefärbt und Areale ohne Myelin erscheinen durch die Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung rosa.

Die entparaffinierten Schnitte wurden in Luxol Fast Blue-Lösung gestellt und über Nacht bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden sie kurz in 0,05 %iger Lithiumcarbonat-Lösung differenziert und in 70 %igem Ethanol und Aqua bidest. gespült. Darauf folgend erfolgte eine fünfminütige Inkubation in 1 % Periodsäure und Leitungswasser. Nach kurzem Spülen in Aqua bidest. erfolgte die Inkubation in Schiff's Reagenz für 20 min. Vor und nach der abschließenden zweiminütigen Färbung mit Hämatoxylin wurden die Präparate 5 min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Abschließend wurden die Präparate in

Aqua bidest. überführt und wie bereits oben beschrieben (s. Paraffinschnitte) in steigender Ethanolreihe bis in Xylol hochgeführt und dem Eindeckmedium Eukitt eingedeckelt.

2.2.15 Immunhistochemische Färbungen

Alle Inkubations- und Blockierschritte wurden in einer feuchten Kammer, alle Waschschriffe in Küvetten durchgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden pro Schnitt jeweils 100 µl Lösung auf die Schnitte gegeben. Primärantikörper wurden über Nacht bei 4 °C und Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert.

Einfachfärbungen

Nach der Entparaffinierung erfolgte der Antigen-Demaskierungsschritt wie angegeben (s. 2.1.9 Antikörper). Bei der Mikrowellenbehandlung (MW) wurden die Schnitte im jeweiligen Puffer insgesamt 15 min (5 x 3 min) in der Mikrowelle unter Kontrolle des Füllstands aufgeköcht. Bei der Behandlung im Dampfgerat wurden die Schnitte im jeweiligen Puffer für 40 Minuten im Dampfgerat aufgeköcht. In dem Fall, dass keine Vorbehandlung durchgeführt werden muss, entfällt die Demaskierung.

Nach der Demaskierung wurden die Schnitte dreimal für 2 min in PBS gewaschen. Darauf folgend wurde die endogene Peroxidase durch eine 20 minütige Inkubation in 3 %iger H₂O₂ in PBS bei 4 °C blockiert. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen und danach für 20 Minuten mit 10 %igen FKS in PBS geblockt. Die Blockierlösung wurde abgegossen und der jeweilige Primärantikörper in der angegebenen Verdünnung in 10 %igem FKS/PBS aufgetragen, mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal in PBS gewaschen und der gegen die jeweilige Spezies des Primärantikörper gerichtete biotinylierte Sekundärantikörper 1:400 verdünnt in 10 %igem FKS/PBS auf die Schnitte gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Erneut folgte ein Waschschriff und eine Inkubation mit 1:1.000 in 10 %igem FKS/PBS verdünnter „ExtrAvidin Peroxidase“ (POX) für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde ein letztes Mal dreimal in PBS gewaschen und für 5 - 15 min in DAB-Entwicklerlösung unter mikroskopischer Kontrolle entwickelt. Die entwickelten

Schnitte wurden analog zur Hämatoxylin / Eosin-Färbung für 2 min mit Hämatoxylin gegengefärbt, entwässert und eingedeckelt.

Doppelfärbungen

Die Schnitte wurden entparaffiniert und der Demaskierungsschritt des ersten Primärantikörpers, der stets gegen im Kern vermutete Proteine gerichtet ist, durchgeführt. Analog zur Einfachfärbung wurde fortgefahren, mit dem Unterschied, dass PBS durch TBS ersetzt wurde. Als Sekundärantikörper wurde am 2. Tag ein gegen den jeweiligen Primärantikörper gerichteter, Alkalische-Phosphatase(AP)-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt. 60 µl der Antikörperverdünnung (1:50) in 10 % FKS/TBS wurden je Schnitt aufgetragen und mit Parafilm abgedeckt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei RT. Nach erneutem Waschen in TBS wurde in NBT/BCIP-Entwicklungslösung für 15 – 30 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle entwickelt.

Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und es folgte die Inkubation vom zweiten Primärantikörper in angegebener Verdünnung in 10 % FKS/TBS über Nacht bei 4 °C. Es wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Schnitte anschließend mit dem gegen den zweiten Primärantikörper gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper (1:400) 1 h bei RT inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation mit POX (1:1000) für 1 h bei RT, gefolgt von einem erneuten Waschschrift in PBS. Die Entwicklung wurde für 15 – 30 min unter mikroskopischer Kontrolle in AEC-Entwicklerlösung durchgeführt. Die Gegenfärbung in Hämatoxylin erfolgte analog zur Einfachfärbung.

Fluoreszenzfärbungen

Nach erfolgter Entparaffinierung und 20 minütigem Blockieren mit 20 % FKS/PBS wurden beide Primärantikörper in den angegebenen Verdünnungen in 20 % FKS/PBS auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden nacheinander die gegen die jeweiligen Primärantikörper gerichteten und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben und für je 1 h bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte in Mowiol mit DAPI (1:10.000) eingedeckelt und bei -20 °C gelagert.

2.2.16 Quantifizierung der Histologie

Die Auszählung der Präparate erfolgte unter dem Mikroskop mit einer 1.000-fachen Vergrößerung und Zuhilfenahme eines Zählgitters. Es wurden pro Präparat zehn Gitterfelder ausgezählt. Jedes Gitterfeld entsprach dabei einer Fläche von 10.000 μm^2 . Für jedes Präparat wurde der Mittelwert gebildet und auf Zellen / mm^2 hochgerechnet. Die entstandenen Mittelwerte wurden gruppiert und für jede Gruppe der Mittelwert und der Standardfehler (SEM) gebildet.

Zur Quantifizierung der Myelinisierung wurde die Färbung mittels des gegen MBP gerichteten Antikörpers verwendet und eine semiquantitative Einteilung verwendet. Im Falle des *Corpus callosum* der Maus reichte diese von 0 bis 4:

Wert	Bedeutung
0	kein Myelin
1	einzelne Myelinfasern
2	fleckiges Myelin
3	flächiges Myelin
4	vollständig myelinisiert

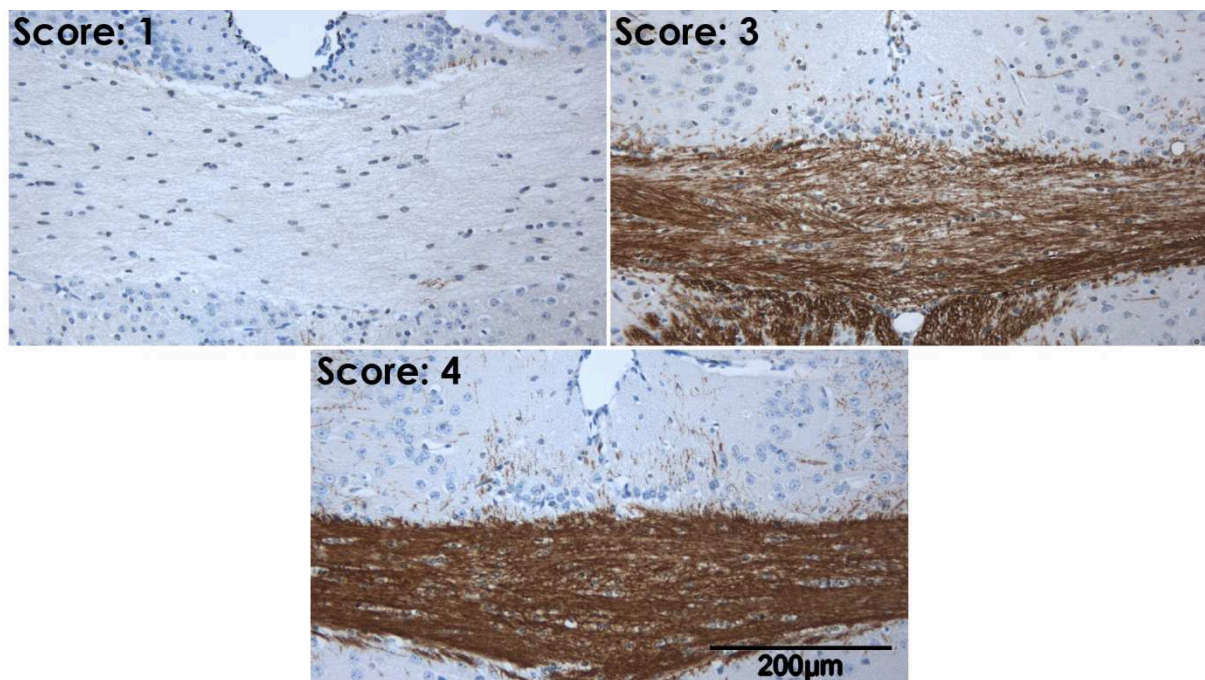


Abb. 4: Beispiele für Myelinisierungsscores in der Entwicklung der Maus anhand von MBP-Färbungen.

Analog zur Myelinisierung wurde die Demyelinisierung im *Corpus callosum* folgendermaßen bewertet:

Wert	Bedeutung
0	keine demyelinisierten Bereiche
1	wenige demyelinisierte Bereiche
2	wenig Myelin, überwiegend demyelinisiert
3	Demyelinisierung reicht über die lateralen Ventrikel hinaus
4	kein Myelin

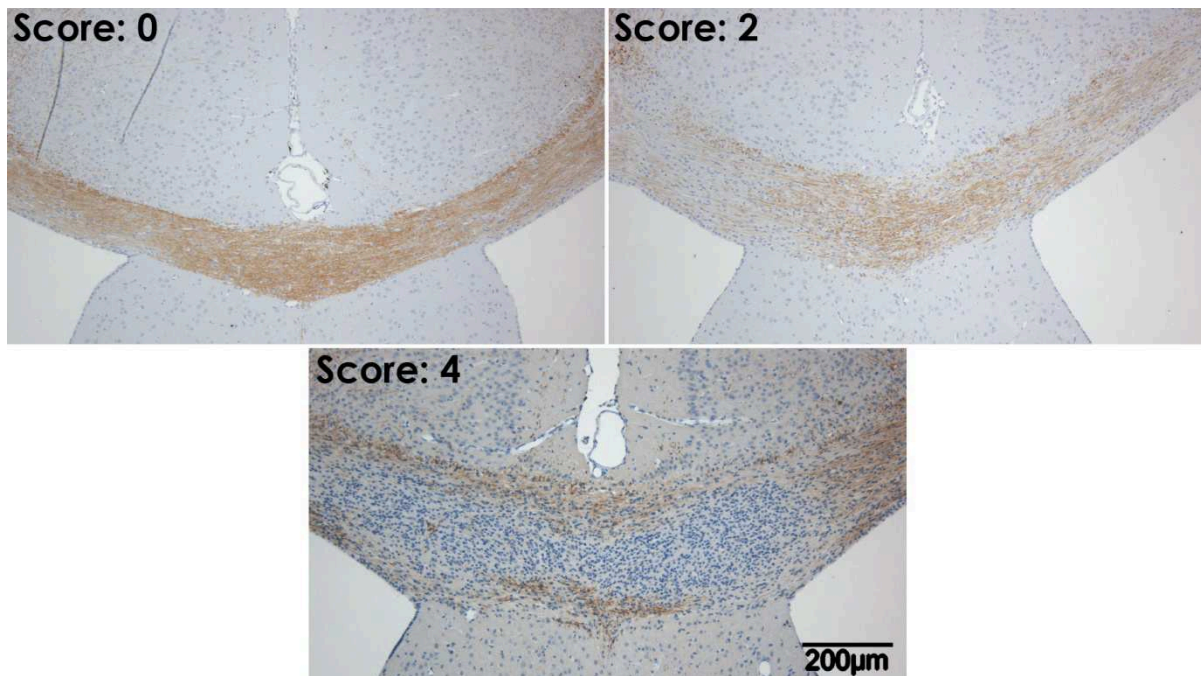


Abb. 5: Beispiele für Demyelinisierungsscores in der toxischen Demyelinisierung der Maus anhand von MBP-Färbungen.

Bei der Beurteilung der humanen Schnitte wurde eine Einteilung von 0 bis 5 verwendet:

Wert	Bedeutung
0	kein Myelin
1	einzelne Myelinfasern
2	fleckiges Myelin
3	flächenhafte Myelinisierung
4	vollständig myelinisiertes Marklager
5	vollständig myelinisiertes Marklager und Kortex

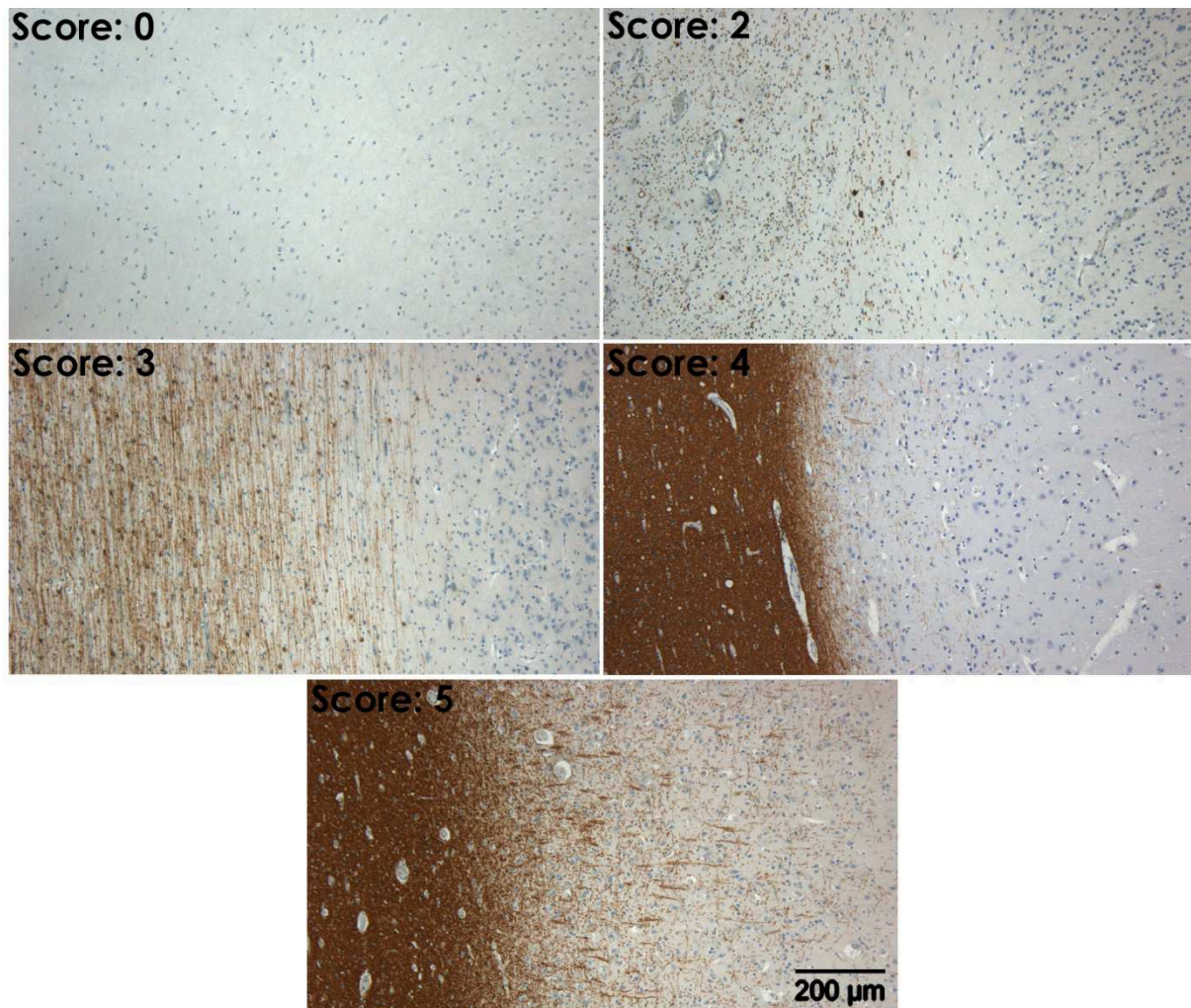


Abb. 6: Beispiele für Myelinisierungsscores während der humanen Entwicklung anhand der MBP-Färbung.

2.2.17 Statistische Analyse

Die generierten Daten wurden mittels der Analysefunktionen des Programms GraphPad Prism 5.01 analysiert. Alle gezeigten Daten sind als Mittelwerte (MW) mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *engl.: standard error of the mean*) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaarten Student t-Tests oder einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Wurden zwei Merkmale überprüft wurde dementsprechend eine multifaktorielle Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni Korrektur durchgeführt. Das Vertrauensintervall lag bei 95 %. Die bestimmten Signifikanzen werden nachfolgend mit Sternchen abgekürzt: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Identifikation von Kandidatengenen für den oligodendroglialen Zelltod im Cuprizonmodell

Um Kandidatengene zu bestimmen, die für den oligodendroglialen Zelltod im Cuprizonmodell verantwortlich sind, wurde eine Mikroarrayanalyse durchgeführt, was bereits von Hesse et al. beschrieben wurde (Hesse, 2010). Dazu wurden die *Corpora callosa* cuprizonbehandelter Mäuse mittels Lasermikrodissektion ausgeschnitten und RNA extrahiert. Für die aktuelle Arbeit wurden nur apoptoseassoziierte Gene, wie Effektoren des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs als auch Caspasen, weiter analysiert.

Die Expressionsprofile der Gene *Puma* und *Noxa* zeigen ein Expressionsprofil (Abb. 7a) analog zur Anzahl aktivierter Caspase 3 (CPP32) positiver Zellen im Cuprizonmodell (Abb. 7b) (Hesse et al., 2010). Der Trend dieses Expressionsprofils wurde mittels qRT-PCR der gleichen RNA bestätigt, wobei die Höhe der relativen Expressionslevel aus der Mikroarrayanalyse nicht erreicht wurde (Abb. 7c).

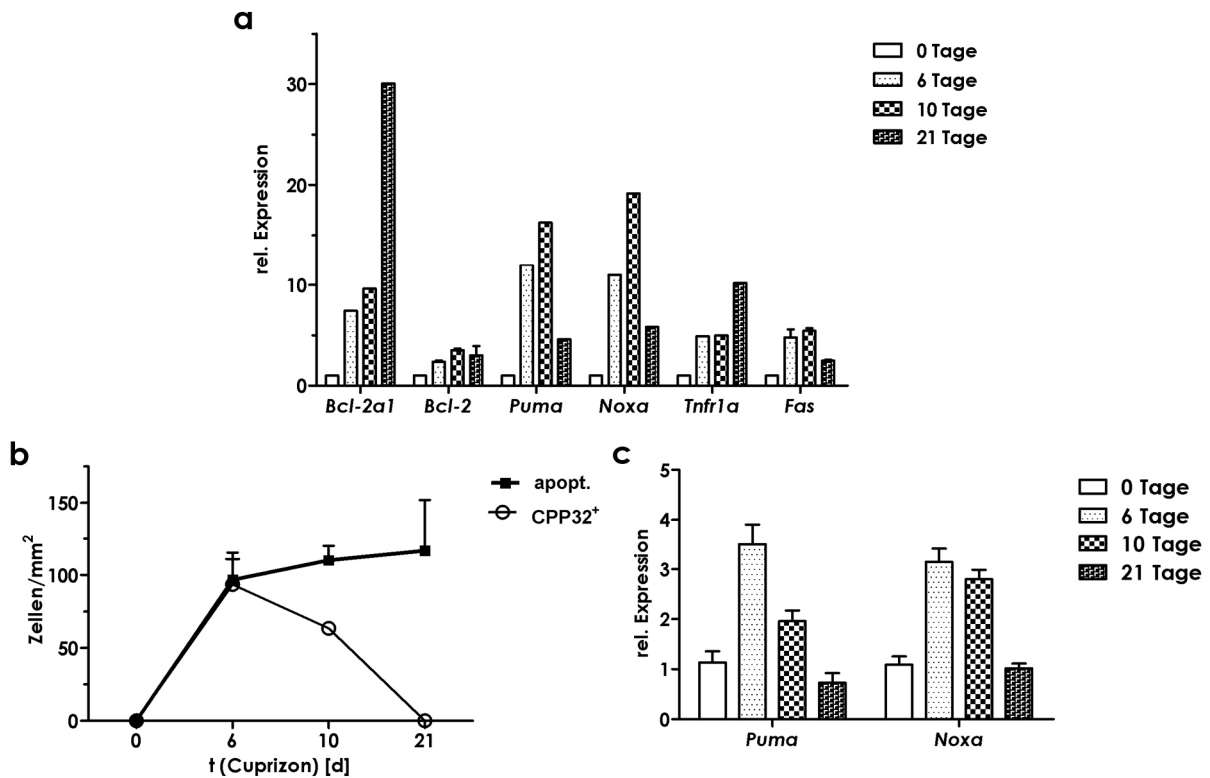


Abb. 7: Expressionsanalyse von mit Cuprizon behandelten C57BL/6 Mäusen. Die apoptoseassoziierten Gene *Puma* und *Noxa* zeigten ein ähnliches Expressionsprofil (a) wie aktivierte Caspase 3 positive Zellen (CPP32⁺) in der IHC (b) (Hesse et al., 2010, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags). Die Expressionslevel von *Puma* und *Noxa* aus der Mikroarrayanalyse wurden in der qRT-PCR nicht erreicht, aber der Trend wurde bestätigt (c).

3.2 Genexpression in der oligodendroglialen Zelllinie CG-4

Um zu ermitteln, ob die im Cuprizonmodell beobachtete differentielle Expression der Gene *Puma* und *Noxa* auf eine veränderte Genexpression in Oligodendrozyten nach Zelltodinduktion zurückgeführt werden kann, wurde *in vitro* die oligodendrogliale Zelllinie CG-4 für 24 h mit zwei verschiedenen Zelltodinduktoren, Staurosporin und SNAP-(S-Nitroso-N-acetylpenicillinamin), inkubiert und die Expressionslevel von *Puma* und *Noxa* mittels qRT-PCR bestimmt. Staurosporin wurde erstmals aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert und induziert Apoptose durch die Inhibition einer Vielzahl von Kinasen (Karaman et al., 2008; Omura et al., 1977). SNAP ist ein Stickstoffmonooxid donor und induziert Zelltod durch oxidativen Stress.

Zunächst wurde ein MTT-Test mit verschiedenen Staurosporin- und SNAP-Konzentrationen an der Zelllinie CG-4 durchgeführt, um die Abnahme der Zellviabilität zu bestimmen. Nach 24 h Inkubation verringerte sich sowohl mit ansteigenden Staurosporin- (Abb. 8a) als auch SNAP-Konzentrationen (Abb.

8b) die respiratorische Aktivität relativ zur unbehandelten Kontrolle, während die relativen Genexpressionen von *Puma* und *Noxa* anstiegen (Abb. 8c/d). Ausnahmen stellen die Stagnation bzw. der Einbruch der *Puma*- und *Noxa*-Expression bei 500 μM Zugabe von SNAP dar.

Die Daten zeigen, dass auch *in vitro* mit zunehmendem oligodendroglialem Zelltod die Expression der Kandidatengene *Puma* und *Noxa* steigt.

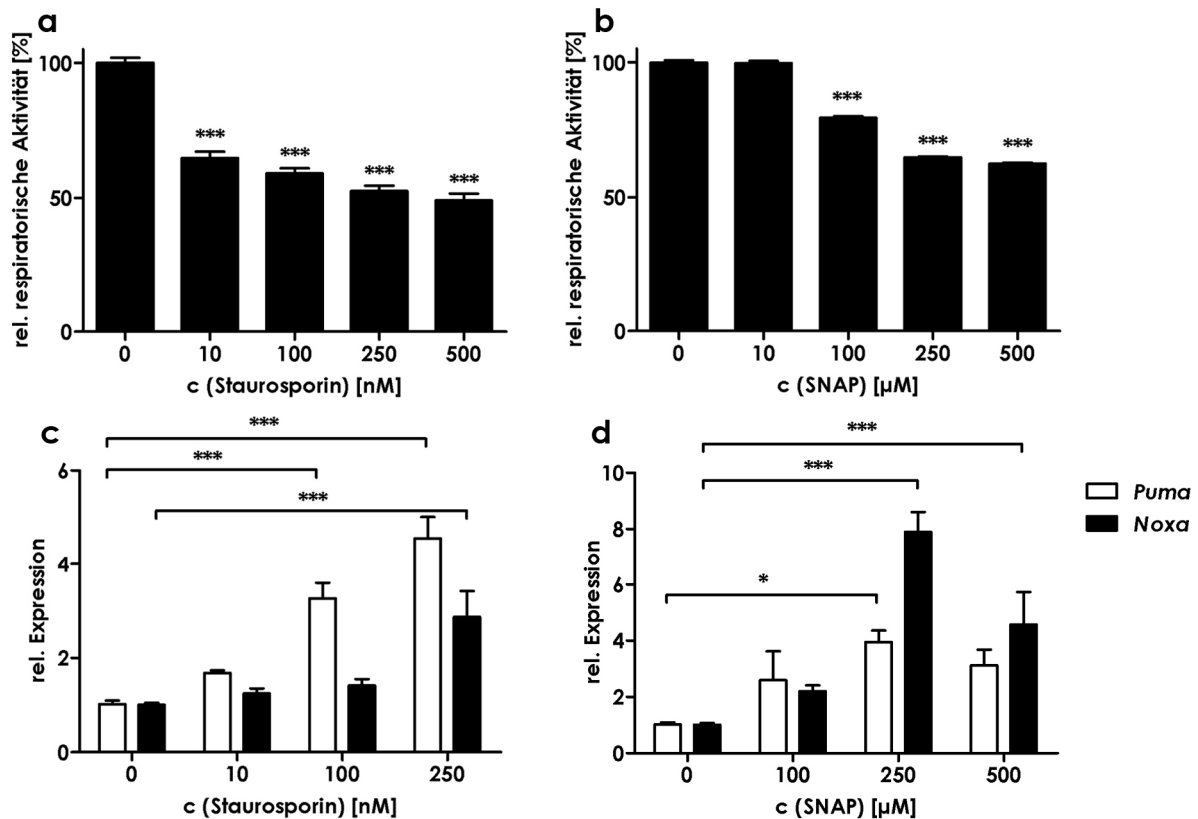


Abb. 8: Genexpression und Zellviabilität nach Gabe von Apoptoseinduktoren *in vitro*. Die respiratorische Aktivität von CG-4 Zellen nimmt mit Gabe von Staurosporin (a) und SNAP (b) ab. Gleichzeitig nimmt die Expression von *Puma* (c) und *Noxa* (d) zu. Eine Ausnahme bildet der Wert für 500 μM SNAP; hier bricht die Expression von *Noxa* gegenüber dem Wert bei 250 μM ein und die *Puma*expression stagniert.

3.3 Rolle von PUMA im Cuprizinmodell

Nachdem die Ergebnisse der initialen *in vivo* (s.: 3.1) und *in vitro* (s.: 3.2) Experimente einen Zusammenhang zwischen dem cuprizininduzierten oligodendroglialem Zelltod und der Expression von *Puma* vermuten ließen, wurden Cuprizinexperimente mit *Puma*-defizienten (*Puma*^{-/-}) Mäusen und ihren *Puma*^{+/+} Geschwistern durchgeführt, um den Einfluss von *Puma* auf verschiedene Parameter des Cuprizinmodells zu beleuchten. Hierfür wurden im *Corpus callosum* mittels histologischer Methoden Apoptosen, CPP32-positive (CPP32⁺) Zellen, oligodendrogliale Zellen und Mikroglia/Makrophagen quantifiziert, sowie der Grad der Demyelinisierung und die Expressionslevel der Myelogene *Mag*, *Mbp* und *Plp* bestimmt.

In diesen Experimenten wurden die Tiere mit 0,1 % Cuprizinfutter gefüttert. Bei der Verwendung von 0,1 % Cuprizin kommt es zu einer ähnlichen Induktion von oligodendroglialem Zelltod im *Corpus callosum* wie bei der Gabe von 0,3 % Cuprizin, aber die Mäuse weisen während des gesamten Experiments einen besseren Allgemeinzustand auf und zeigen keinen signifikanten Gewichtsverlust. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Tiere nach 4, 6, 10, 21 und 42 Tagen Cuprizindiät transkardial perfundiert. Für die Bestimmung der Myelingenexpression wurden *Puma*^{+/+} und *Puma*^{-/-} Mäuse nach 6 Tagen Cuprizindiät perfundiert.

3.3.1 Expression von Myelinenen in *Puma*^{-/-} Mäusen

Zur Bestimmung des Einflusses von *Puma* auf die Myelingenexpression während des frühen Zelltods im Cuprizinmodell wurden die relativen Expressionslevel der Myelogene *Mag*, *Mbp* und *Plp* in *Puma*^{-/-} und *Puma*^{+/+} Mäusen nach sechstägiger 0,1 %iger Cuprizingabe mittels qRT-PCR bestimmt.

Die qRT-PCR ergab an Tag 6 eine signifikant geringere Expression aller drei überprüften Myelogene in *Puma*^{+/+} Tieren gegenüber ihren *Puma*^{-/-} Geschwistern (Abb. 9).

Die relativ zu den *Puma*^{-/-} Mäusen verringerte Myelingenexpression in den *Puma*^{+/+} Mäusen kann ein Indiz für ein geringeres Ausmaß des oligodendroglialen Zelltods sein.

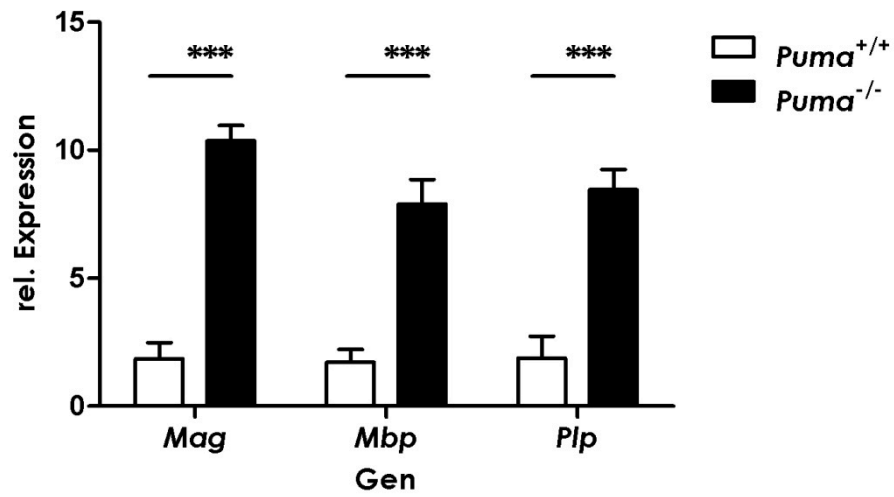
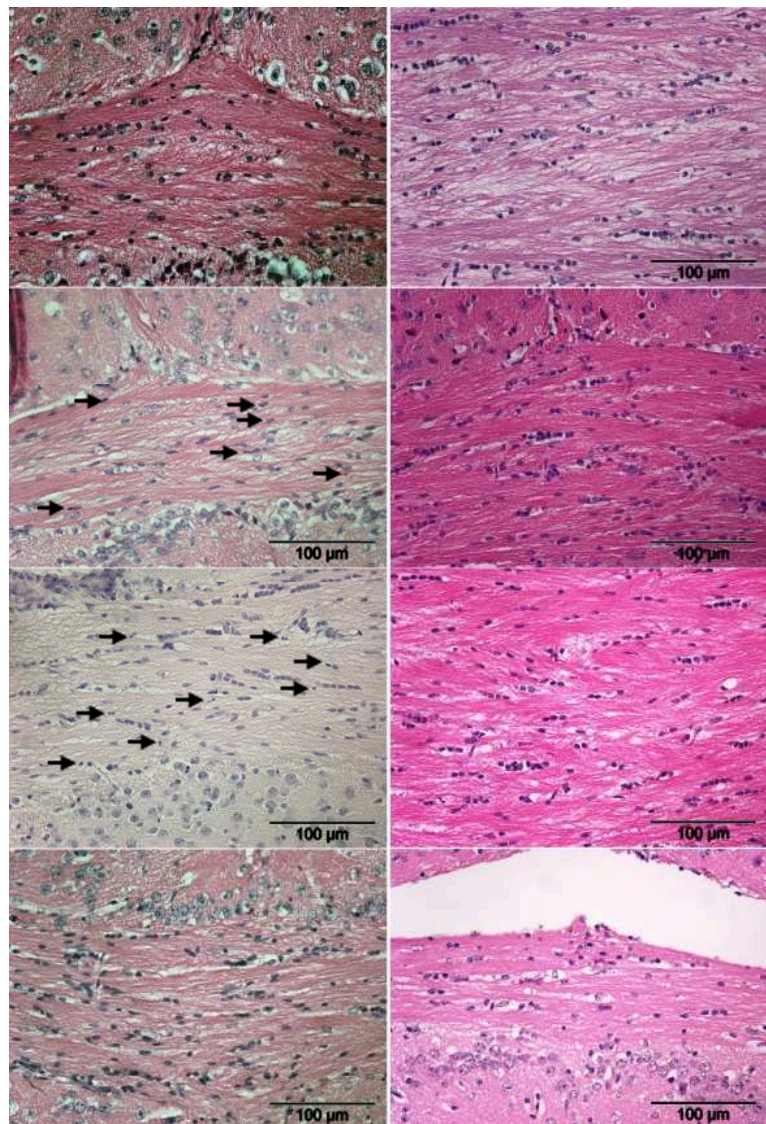


Abb. 9: Myelinenexpression nach 6 Tagen 0,1 % Cuprizondiät in *Puma*^{+/+} und *Puma*^{-/-} Mäusen. Die Expression der Myelogene *Mag*, *Mbp* und *Plp* ist in *Puma*^{+/+} verglichen mit ihren *Puma*^{-/-} Geschwistertieren signifikant geringer.

3.3.2 Oligodendroglialer Zelltod im Corpus callosum von *Puma*^{-/-} Mäusen

Um beurteilen zu können, ob PUMA einen Einfluss auf den cuprizoninduzierten Zelltod hat, wurden an den angefertigten koronaren Schnitten aus den für 4, 6, 10, 21 und 42 Tagen mit Cuprizon behandelten Tieren sowie den Kontrolltieren (0 Tage) HE- (Abb. 11) und CPP32-Färbungen (Abb. 12) durchgeführt. Die Anzahl der Apoptosen wurde zum einen anhand von morphologischen Kriterien (HE), zum anderen durch Nachweis von aktivierter Caspase 3 (CPP32), einer zentralen Effektor-



caspase, quantifiziert. Um den oligodendroglialen Zellverlust während der

Abb. 10 **Abb. 11:** HE-Färbungen von *Puma*^{+/+} (links) und *Puma*^{-/-} (rechts) Mäusen nach 0, 6, 10 und 42 Tagen Cuprizonbehandlung (von oben nach unten) mit apoptotischen Zellen (Pfeil).

Cuprizongabe zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von OLIG2, einem Marker der Oligodendroglia, durchgeführt.

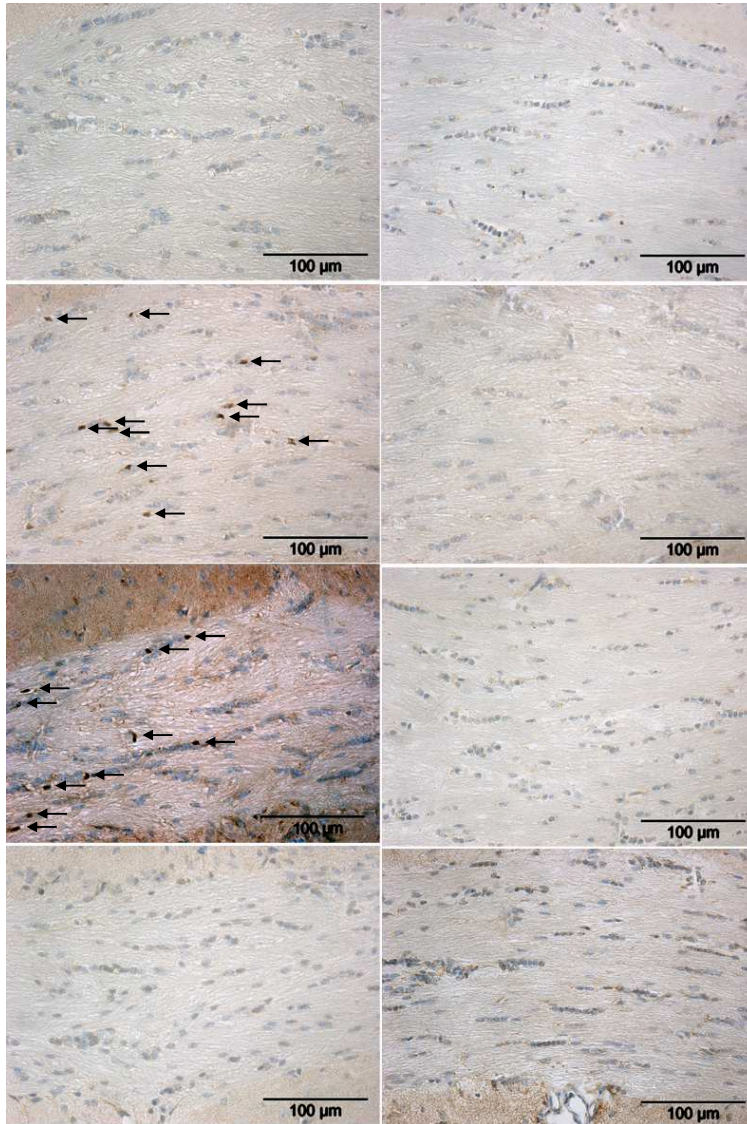


Abb. 12: CPP32-Färbungen von *Puma*^{+/+} (links) und *Puma*^{-/-} (rechts) Mäusen nach 0, 6, 10 und 42 Tagen Cuprizonbehandlung (von oben nach unten) mit CPP32⁺ Zellen (Pfeil).

Bereits nach 4 Tagen Cuprizonbehandlung waren in den *Puma*^{+/+} Mäusen apoptotische (Abb. 13a) und CPP32⁺ (Abb. 13c) Zellen nachweisbar. Die Anzahl an CPP32⁺-Zellen und Zellen mit apoptotischer Morphologie nahm bis Tag 10 der Behandlung zu und sank zum Tag 21 ab. Nach 42 Tagen waren keine oder nur wenige apoptotische und CPP32⁺-Zellen mehr nachweisbar. In den *Puma*^{-/-} Mäusen waren hingegen zu allen untersuchten Zeitpunkten keine oder nur wenige apoptotische oder CPP32⁺ Zellen vorhanden. In den *Corpora callosa* von *Puma*^{-/-} Mäusen waren zu allen Zeitpunkten mehr

OLIG2-positive (OLIG2⁺) Zellen nachweisbar als in den *Puma*^{+/+} Geschwistertieren; signifikant war der Unterschied an den Tagen 4 und 10 (Abb. 13e). In den LFB-PAS-Färbungen wurde weder in *Puma*^{-/-} noch in *Puma*^{+/+} Mäusen eine signifikante Demyelinisierung des *Corpus callosum* während der Cuprizongabe beobachtet (Daten nicht abgebildet).

Die verringerte Anzahl bzw. Abwesenheit von Apoptosen und CPP32⁺ Zellen nach Cuprizongabe in den *Corpora callosa* der *Puma*^{-/-} Mäuse sowie die geringere Anzahl an oligodendroglialen Zellen in *Puma*^{+/+} gegenüber *Puma*^{-/-}

Mäusen während der Cuprizongabe, legen den Schluss nahe, dass PUMA eine zentrale Rolle im cuprizonvermittelten Zelltod spielt.

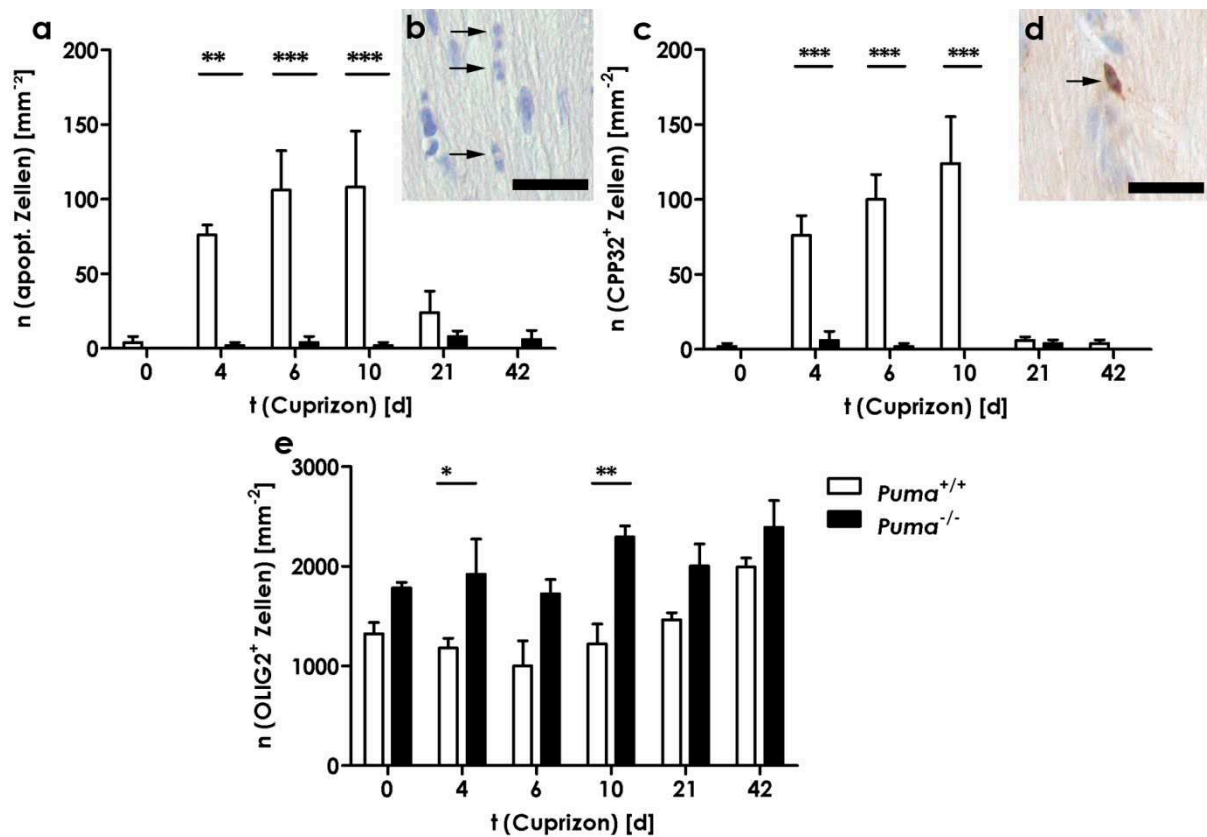


Abb. 13: Histologische Auswertung des cuprizoninduzierten Zelltods in *Puma*^{+/+} und *Puma*^{-/-} Mäusen während einer 0,1 %igen Cuprizonbehandlung. Die Anzahl der apoptotischen Zellen stieg in *Puma*^{+/+} Mäusen bis Tag 10 an und reduzierte sich zu Tag 21. In den *Puma*^{-/-} Mäusen waren hingegen über den gesamten Zeitraum keine oder nur wenige apoptotische Zellen zu finden. Für die jeweilige Behandlungsdauer in Tagen betragen die MW ± SEM der Anzahl apoptotischer Zellen [mm⁻²] in *Puma*^{+/+} Mäusen: 0: 4 ± 4 | 4: 76 ± 7 | 6: 106 ± 27 | 10: 108 ± 38 | 21: 24 ± 14 | 42: 0; und in *Puma*^{-/-} Mäusen: 0: 0 | 4: 2 ± 2 | 6: 4 ± 4 | 10: 2 ± 2 | 21: 8 ± 4 | 42: 6 ± 6. Die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen waren an Tag 4, 6 und 10 signifikant, (a) (**: p < 0,01; ***: p < 0,001). Exemplarisch ein Ausschnitt einer HE-Färbung aus einer 6 Tage mit 0,1 % Cuprizon gefütterten *Puma*^{+/+} Maus mit Zellen die apoptotische Morphologie aufweisen (Pfeile) (b). Die Auswertung der CPP32-Färbung zeigt ebenfalls einen Anstieg der CPP32⁺ Zellen bis Tag 10 und eine Verringerung ab Tag 21 in den *Puma*^{+/+} Mäusen, während in den *Puma*^{-/-} Mäusen kaum oder keine CPP32⁺ Zellen vorhanden waren. Die Anzahlen der CPP32⁺ Zellen [mm⁻²] betragen in *Puma*^{+/+} Mäusen: 0: 2 ± 2 | 4: 76 ± 13 | 6: 100 ± 17 | 10: 124 ± 31 | 21: 6 ± 2 | 42: 2 ± 2; und in *Puma*^{-/-} Mäusen: 0: 0 | 4: 6 ± 6 | 6: 2 ± 2 | 10: 0 | 21: 4 ± 2 | 42: 0. Die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen waren an den Tagen 4, 6 und 10 signifikant. Exemplarisches Bild einer CPP32-Färbung einer 6 Tage mit 0,1 % Cuprizon gefütterten *Puma*^{+/+} Maus mit einer CPP32⁺ Zelle (Pfeil) (d). Die Auswertung der OLIG2-Färbung zeigte zu jedem Zeitpunkt mehr OLIG2⁺ Zellen in *Puma*^{-/-} als in *Puma*^{+/+} Mäusen, der Unterschied war an den Tagen 4 und 10 signifikant. Die Anzahlen der OLIG2⁺ Zellen [mm⁻²] betragen in *Puma*^{+/+} Mäusen 0: 1324 ± 111 | 4: 1182 ± 97 | 6: 1002 ± 253 | 10: 1224 ± 196 | 21: 1464 ± 70 | 42: 1994 ± 90; und in *Puma*^{-/-} Mäusen 0: 1783 ± 55 | 4: 1920 ± 353 | 6: 1724 ± 146 | 10: 2294 ± 112 | 21: 2004 ± 219 | 42: 2390 ± 271. Die Unterschiede zwischen den Genotypen waren an Tag 4 und 10 signifikant, (e) (*: p < 0,05).

3.3.3 Aktivierung der Mikroglia

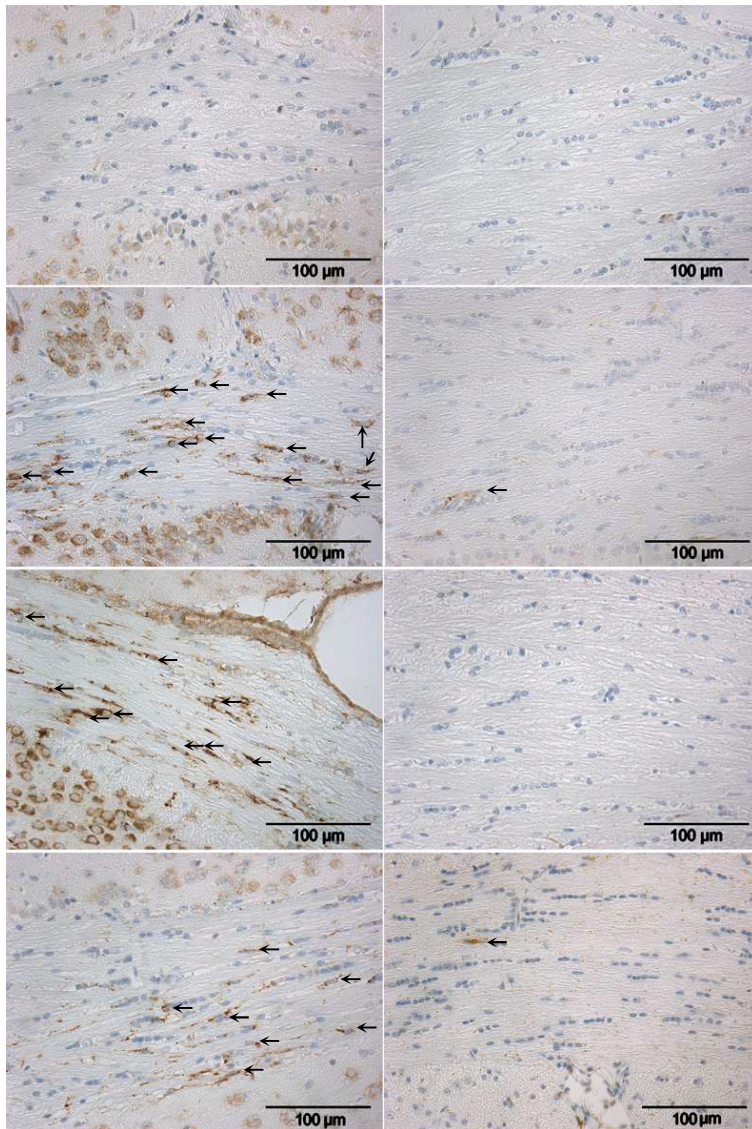


Abb. 14: Mac3-Färbungen von *Puma*^{+/+} (links) und *Puma*^{-/-} (rechts) Mäusen nach 0, 6, 10 und 42 Tagen Cuprizonbehandlung (von oben nach unten) mit Mac3⁺ Zellen (Pfeil).

Zur Quantifizierung von aktivierten Mikroglia im *Corpus callosum*, einem weiteren Parameter des Cuprizonmodells, wurden MAC3-Färbungen der koronaren Paraffinschnitte durchgeführt (Abb. 14) und die positiven Zellen gezählt (Abb. 15b). Der MAC3-Antikörper reagiert mit dem MAC3-Antigen (Chen et al., 1985), welches von aktivierten murinen Makrophagen und Mikroglia exprimieren wird. Die Auswertung der Färbungen ergab, dass in *Puma*^{+/+} Mäusen ab Tag 4 eine vermehrte Anzahl von MAC3-positiven (MAC3⁺) Zellen vorhanden ist, die mit Tag 10 wieder

abnimmt. In *Puma*^{-/-} Mäusen hingegen bleibt die Anzahl der MAC3⁺ Zellen an den Tagen 4, 6 und 10 zunächst in etwa auf dem gleichen Level wie bei den Kontrolltieren (Tag 0). Im weiteren Verlauf ist an Tag 21 und 42 auch in *Puma*^{-/-} Tieren eine zu Kontrolltieren gesteigerte Menge an MAC3⁺ Zellen zu beobachten (Abb. 15a).

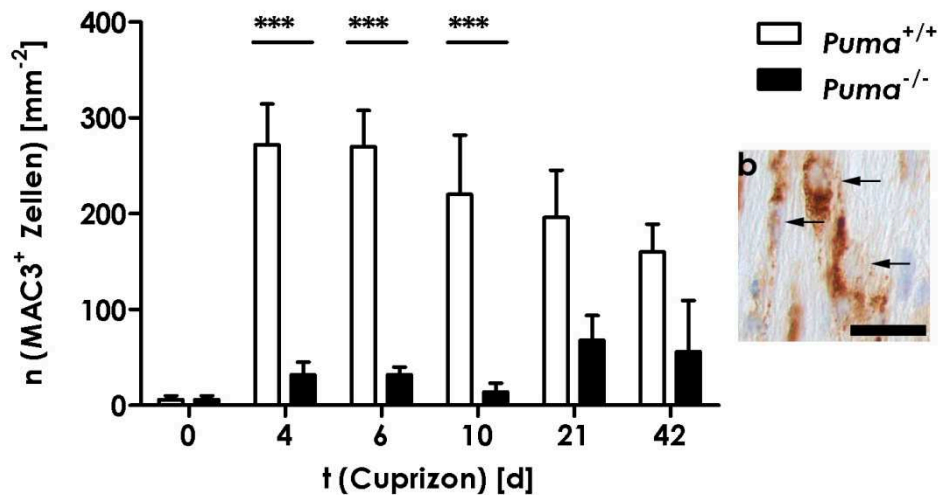


Abb. 15: Auswertung der MAC3-Färbung im *Corpus callosum* von *Puma*^{+/+} und *Puma*^{-/-} Mäusen während einer 0,1 %igen Cuprizongabe. Die Anzahl aktivierter Mikroglia in *Puma*^{+/+} Mäusen war bereits an Tag 4 erhöht und nahm ab Tag 10 langsam ab, blieb jedoch bis Tag 42 gegenüber den Kontrollen (0 Tage) erhöht. In *Puma*^{-/-} Mäusen hingegen war in den ersten 10 Tagen nahezu kein Anstieg der MAC3⁺ Zellen zu beobachten. Erst später, an Tag 21 und 42, stieg die Anzahl an, jedoch ohne das Level der *Puma*^{+/+} Mäuse zu erreichen. Die Anzahlen der MAC3⁺ Zellen [mm⁻²] betragen in *Puma*^{+/+} Mäusen: 0: 6 ± 4 | 4: 272 ± 43 | 6: 270 ± 38 | 10: 220 ± 62 | 21: 196 ± 50 | 42: 160 ± 29; und in *Puma*^{-/-} Mäusen: 0: 6 ± 4 | 4: 32 ± 13 | 6: 32 ± 8 | 10: 14 ± 9 | 21: 68 ± 26 | 42: 56 ± 54. Der Unterschied zwischen den Genotypen war an den Tagen 4, 6 und 10 signifikant, (a) (***: p < 0,001). Exemplarisch ein Ausschnitt aus dem *Corpus callosum* einer MAC3-Färbung einer 6 Tage mit 0,1 % Cuprizon behandelten *Puma*^{+/+} Maus mit markierten MAC3⁺ Zellen (b).

3.4 Rolle von PUMA bei der Aktivierung von primären Mikroglia *in vitro*

Um abzuklären, ob ein Fehlen von Puma auch einen Einfluss auf die Mikrogliaaktivierung hat, wurden aus *Puma*^{+/+} und *Puma*^{-/-} Mäusen Mikroglia präpariert, in Kultur genommen und mit LPS und IFN γ aktiviert.

Aus aktivierten Mikroglia und parallel mitgeführten Kontrollen wurde die RNA extrahiert und qRT-PCRs zur Ermittlung der Expressionslevel der Entzündungsmarker *Tnfa*, induzierbare Stickstoffmonooxid(NO)-Synthase (*Inos*), β_2 -Mikroglobulin (*B2m*) und Interleukin1 β (*Il1 β*) durchgeführt. Die Auswertung ergab, dass beide Genotypen nach Aktivierung eine Hochregulation der Transkription von *Tnfa*, *Inos* und *Il1 β* zeigten (Abb. 16). Die aus *Puma*^{+/+} Mäusen präparierten Mikroglia zeigten dabei nach Aktivierung höhere Level an Entzündungsmarkern als die aus *Puma*^{-/-} Mäusen präparierten Mikroglia. Signifikant waren die Unterschiede für *Puma*^{+/+} Mikroglia für die Marker *Tnfa*, *Inos* und *Il1 β* . Die *Puma*^{-/-} Mikroglia wiesen einen signifikanten Unterschied bei *Tnfa* auf.

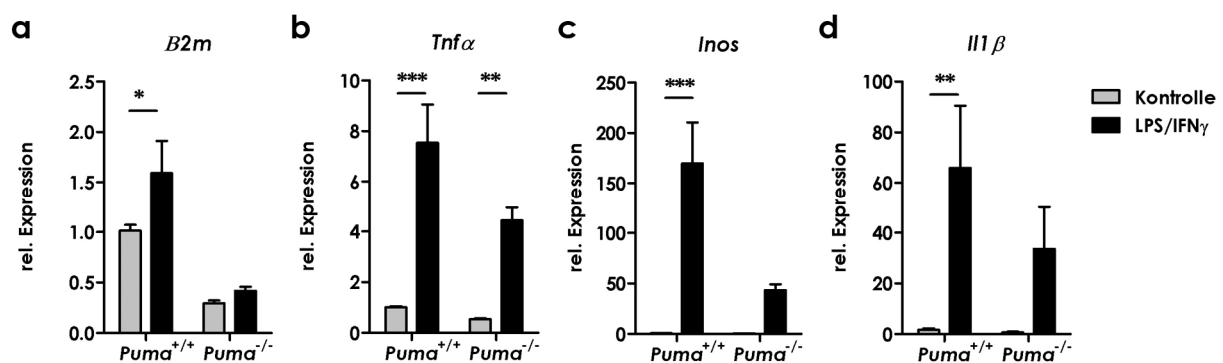


Abb. 16: Relative Expressionslevel von Entzündungsmarkern in primären Mikroglia nach 6 h Inkubation mit LPS und IFN γ verglichen mit unstimulierten Kontrollen. Die *B2m* Expression war in *Puma*^{+/+} Mikroglia signifikant erhöht (a). *Tnfa* wurde nach Stimulation in beiden Genotypen signifikant mehr exprimiert (b). *Inos* (c) und *Il1 β* (d) wurden in *Puma*^{+/+} Mikroglia signifikant höher exprimiert. Für beide war auch in *Puma*^{-/-} Mikroglia eine Hochregulation zu erkennen.

3.5 Rolle von NOXA im Cuprizonmodell

Parallel zu den Cuprizonexperimenten mit *Puma*^{-/-} Tieren wurden die gleichen Cuprizonexperimente mit *Noxa*-defizienten (*Noxa*^{-/-}) Mäusen und ihren Wildtyp (*Noxa*^{+/+}) Geschwistern durchgeführt, da die initialen Experimente (3.1 und 3.2) einen Zusammenhang zwischen dem cuprizoninduziertem oligodendroglialem Zelltod und der *Noxa*-Expression vermuten ließen. Es wurden ebenfalls mittels histologischer Methoden die Apoptosen, CPP32⁺, OLIG2⁺ und MAC3⁺ Zellen quantifiziert sowie der Grad der Demyelinisierung bestimmt.

3.5.1 Oligodendroglialer Zelltod im *Corpus callosum* von *Noxa*^{-/-} Mäusen

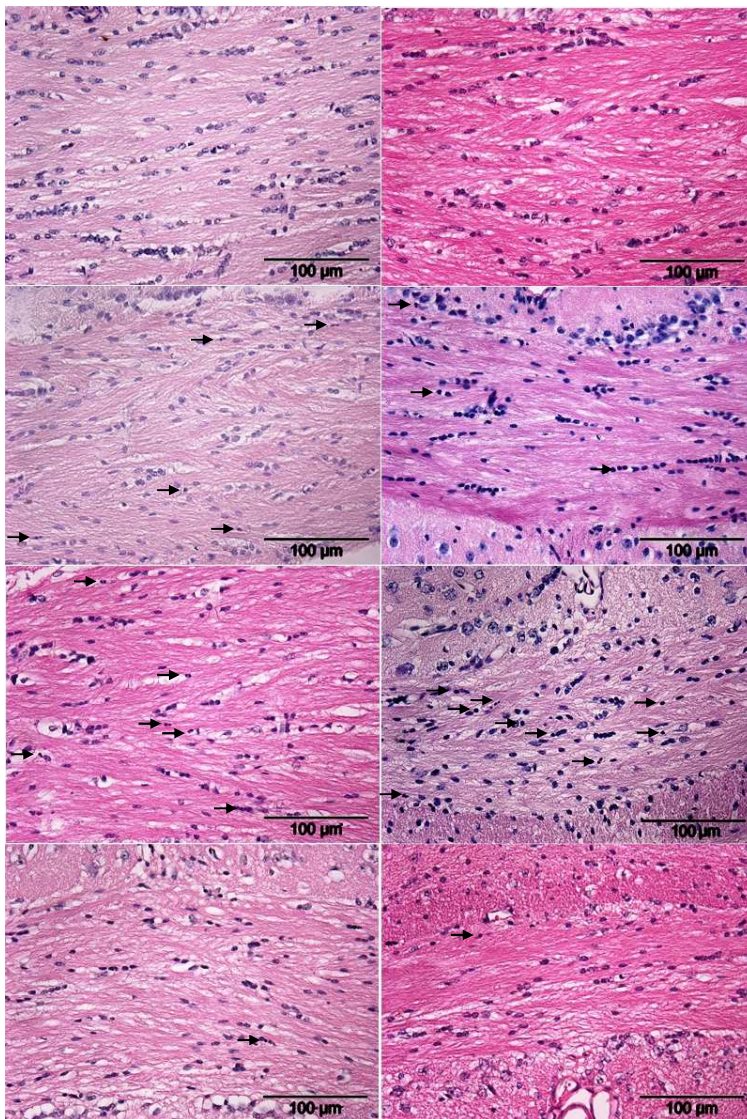


Abb. 17: HE-Färbungen von *Noxa*^{+/+} (links) und *Noxa*^{-/-} (rechts) Mäusen nach 0, 6, 10 und 42 Tagen Cuprizonbehandlung (von oben nach unten) mit apoptotischen Zellen (Pfeil).

Zur weiteren Aufklärung des Einflusses von *Noxa* auf den cuprizoninduzierten Zelltod, wurden an den angefertigten koronaren Schnitten aus den für 4, 6, 10, 21 und 42 Tagen mit Cuprizon gefütterten Mäusen sowie den Kontrolltieren (0 Tage) HE- (Abb. 17) und CPP32-Färbungen (Abb. 18) vorgenommen, um Apoptosen sowohl morphologisch (HE) als auch durch die Aktivierung einer zentralen Effektorcaspase, der Caspase 3, (CPP32) quantifizieren zu können.

Die des Weiteren durchgeführte OLIG2-Färbung sollte

Aufschluss über den Zelltod bedingten Schwund an oligodendroglialen Zellen geben. Die Auswertungen der HE- und CPP32-Färbungen zeigten einen ähnlichen Verlauf für Zellen mit apoptotischer Morphologie in beiden Genotypen während der Cuprizonebehandlung (Abb. 19). Es sind zwar, mit Ausnahme von Tag 42, weniger apoptotische Zellen in den *Noxa*^{-/-} Mäusen zu beobachten, diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant (Abb. 19a). Die Auswertung der CPP32-Färbung zeigt an Tag 4 und 10 eine etwas geringere Anzahl an CPP32⁺ Zellen, allerdings sind auch diese Unter-

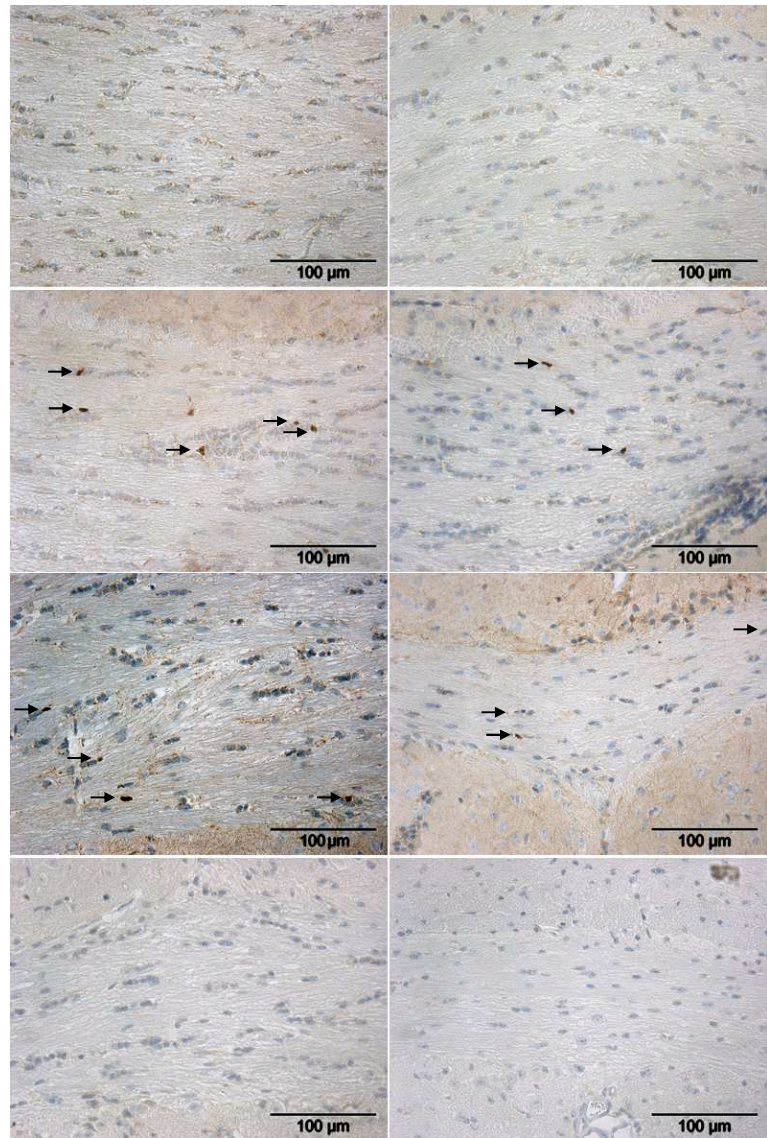


Abb. 18: CPP32-Färbungen von *Noxa*^{+/+} (links) und *Noxa*^{-/-} (rechts) Mäusen nach 0, 6, 10 und 42 Tagen Cuprizonebehandlung (von oben nach unten) mit CPP32⁺ Zellen (Pfeil).

schiede nicht signifikant. An den übrigen Tagen ist die Menge der CPP32⁺ Zellen vergleichbar (Abb. 19b). Die Auswertung der durchgeführten OLIG2-Färbungen ergab ein ähnliches Ergebnis wie die Untersuchungen zur Apoptose. Vor allem an den Tagen 4 und 6, aber auch an Tag 10 ist sowohl in *Noxa*^{-/-} als auch *Noxa*^{+/+} Mäusen ein Verlust an OLIG2⁺ Zellen zu erkennen, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellen lässt. An den Tagen 21 und 42 steigt die Anzahl der Olig2⁺ Oligodendrozyten wieder an (Abb. 19c). In den LFB-PAS-Färbungen wurde weder in *Noxa*^{-/-} noch in *Noxa*^{+/+} Mäusen eine Demyelinisierung des *Corpus callosum* während der Cuprizongabe beobachtet (Daten nicht abgebildet).

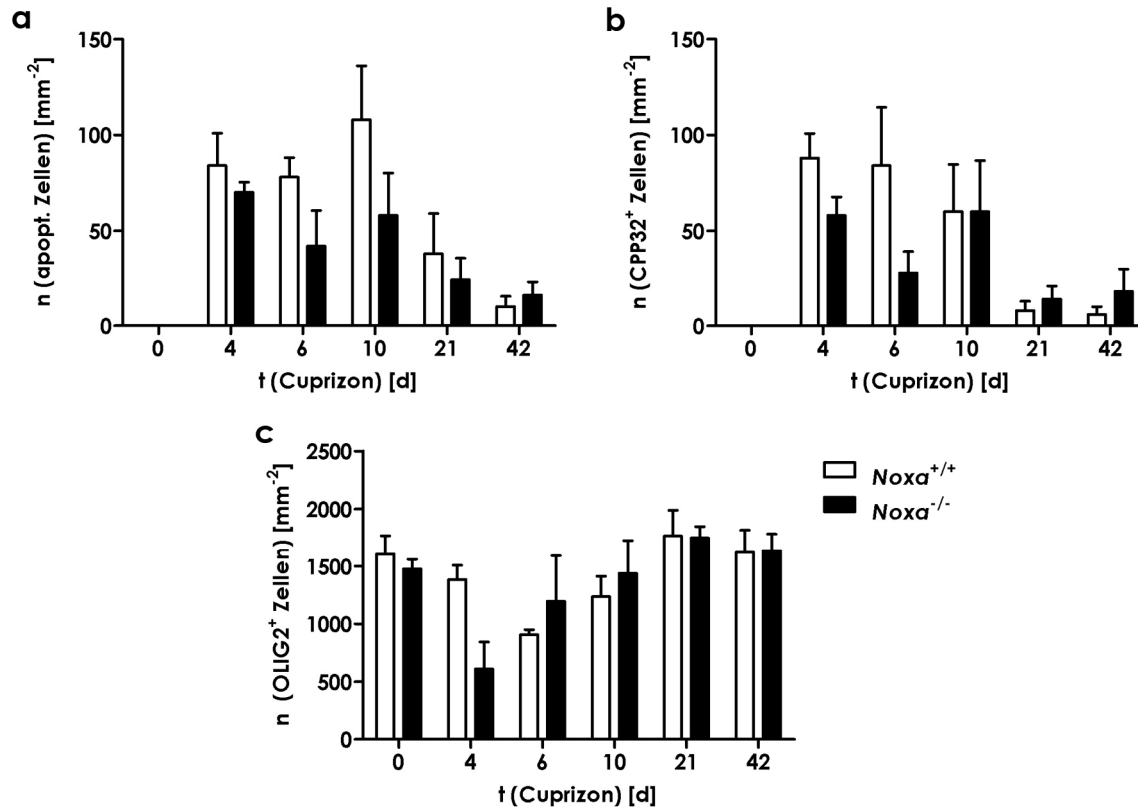


Abb. 19: Histologische Auswertung des cuprizoninduzierten Zelltods in *Noxa*^{+/+} und *Noxa*^{-/-} Mäusen während einer 0,1 % Cuprizonbehandlung. Apoptosen traten in *Noxa*^{+/+} und *Noxa*^{-/-} Mäusen ab Tag 4 auf und waren an den Tagen 4 bis 10 in vergleichbaren Mengen vorhanden. An Tag 21 war die Anzahl reduziert und an Tag 42 wurden nur noch vereinzelt Apoptosen gefunden. Die Anzahlen (MW ± SEM) der Apoptosen betragen in *Noxa*^{+/+} Mäusen: 0: 0 | 4: 84 ± 17 | 6: 78 ± 10 | 10: 108 ± 28 | 21: 38 ± 21 | 42: 10 ± 5. Für *Noxa*^{-/-} Mäuse ergaben sich: 0: 0 | 4: 70 ± 5 | 6: 42 ± 19 | 10: 58 ± 22 | 21: 24 ± 12 | 42: 16 ± 7. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede (a). Die Auswertung der CPP32-Färbung zeigt in *Noxa*^{+/+} und *Noxa*^{-/-} Mäusen ebenfalls an den Tagen 4 bis 10 vergleichbare Mengen von CPP32⁺ Zellen an Tag 21 und 42 sind nur noch vereinzelt CPP32⁺ Zellen vorhanden. Die Anzahlen (MW ± SEM) der CPP32⁺ Zellen betragen in *Noxa*^{+/+} Mäusen: 0: 0 | 4: 88 ± 13 | 6: 84 ± 30 | 10: 60 ± 25 | 21: 8 ± 5 | 42: 6 ± 4. Für *Noxa*^{-/-} Mäuse ergaben sich: 0: 0 | 4: 58 ± 10 | 6: 28 ± 11 | 10: 60 ± 27 | 21: 14 ± 7 | 42: 18 ± 12. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede (b). In *Noxa*^{+/+} Mäusen war an den Tagen 6 und 10 ein Schwund an oligodendroglialen Zellen zu beobachten. Die Anzahl der OLIG2⁺ Zellen näherte sich ab Tag 10 wieder dem Wert der Kontrolle (0 Tage) an und erreichte diesen bereits wieder an Tag 21. In *Noxa*^{-/-} Mäusen war bereits an Tag 4 eine Verringerung an oligodendroglialen Zellen zu beobachten. Die Menge der OLIG2⁺ Zellen nahm bereits an Tag 6 wieder zu und hatte an Tag 21 wieder den Ursprungswert der Kontrolltiere erreicht. Die Anzahlen (MW ± SEM) der OLIG2⁺ Zellen betragen in *Noxa*^{+/+} Mäusen: 0: 1606 ± 163 | 4: 1382 ± 126 | 6: 906 ± 43 | 10: 1234 ± 178 | 21: 1766 ± 223 | 42: 1620 ± 196. Für *Noxa*^{-/-} Mäuse ergaben sich: 0: 1476 ± 83 | 4: 610 ± 233 | 6: 1194 ± 397 | 10: 1436 ± 291 | 21: 1748 ± 99 | 42: 1638 ± 144. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede (c).

3.5.2 Aktivierung der Mikroglia

Wie für die *Puma*^{+/+} und *Puma*^{-/-} Mäuse wurden auch für *Noxa*^{+/+} und *Noxa*^{-/-} Mäuse MAC3-Färbungen durchgeführt (Abb. 20), um die Anzahl der aktivierten Mikroglia während der Cuprizongabe zu bestimmen. Die Auswertung der MAC3-Färbung zeigt einen ähnlichen Verlauf der Mikrogliaaktivierung in *Noxa*^{-/-} und *Noxa*^{+/+} Mäusen. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen vorhanden (Abb. 21).

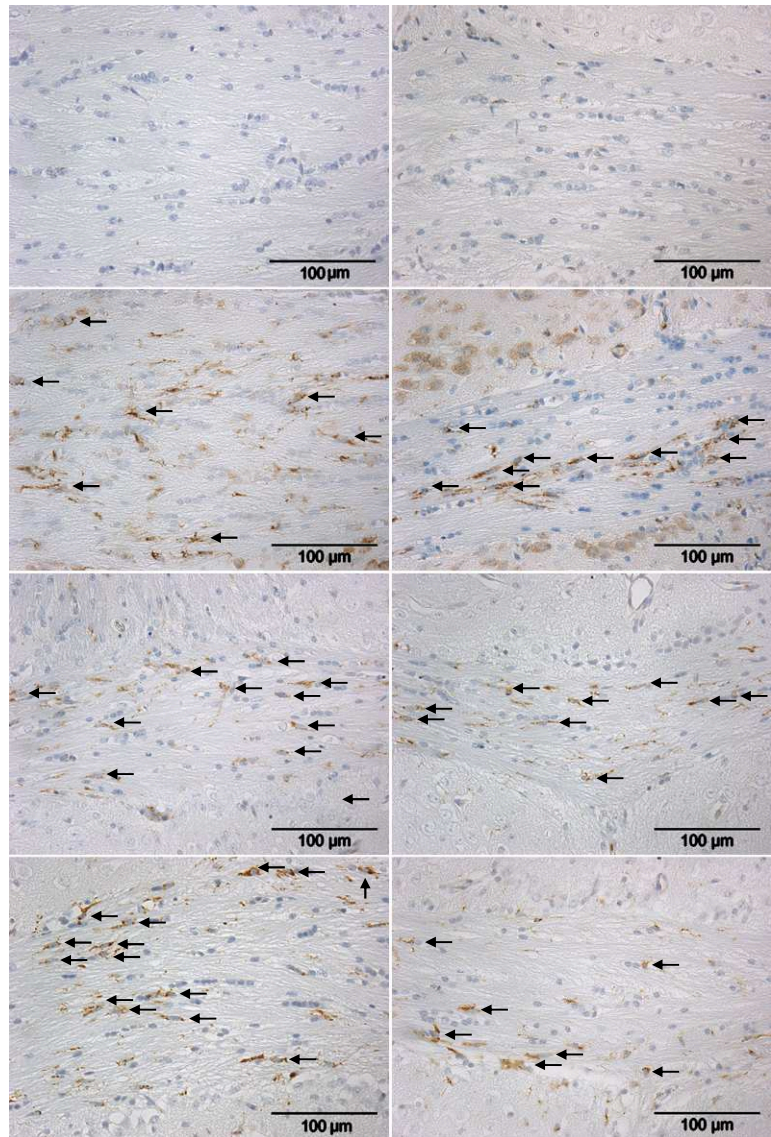


Abb. 20: Mac3-Färbungen von *Noxa*^{+/+} (links) und *Noxa*^{-/-} (rechts) Mäusen nach 0, 6, 10 und 42 Tagen Cuprizonbehandlung (von oben nach unten) mit Mac3⁺ Zellen (Pfeil).

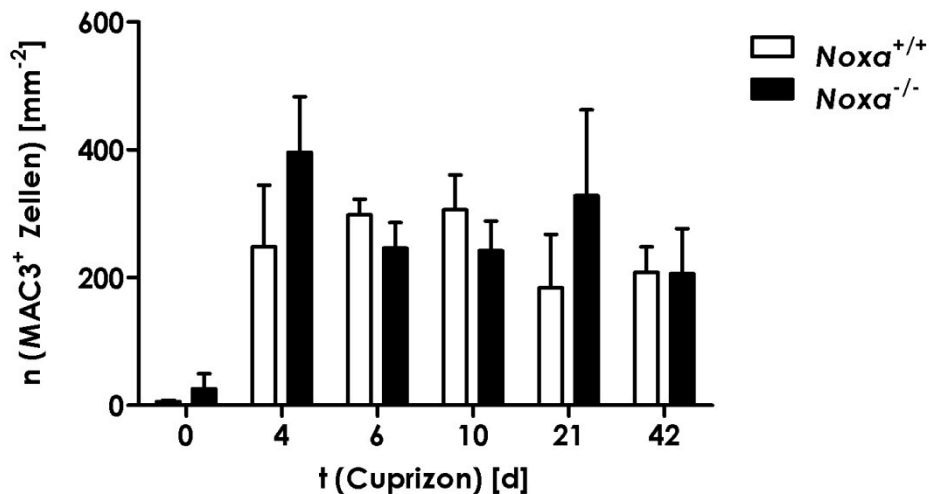


Abb. 21: Histologische Auswertung der Mac3-Färbung im *Corpus callosum* von *Noxa*^{-/-} und *Noxa*^{+/+} Mäusen. In der Mac3-Färbung von cuprizonbehandelten *Noxa*^{-/-} und *Noxa*^{+/+} Mäusen sind an den Tagen 4 bis 42 Mac3⁺ Zellen nachweisbar. Die Anzahlen (MW ± SEM) der Mac3⁺ Zellen [mm⁻²] betragen in *Noxa*^{+/+} Mäusen: 0: 6 ± 2 | 4: 248 ± 97 | 6: 298 ± 25 | 10: 306 ± 55 | 21: 184 ± 84 | 42: 208 ± 40; und in *Noxa*^{-/-} Mäusen: 0: 26 ± 24 | 4: 396 ± 87 | 6: 246 ± 40 | 10: 242 ± 47 | 21: 328 ± 135 | 42: 206 ± 71. Zu keinem Zeitpunkt gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen.

3.6 TCF7L2 in der murinen Entwicklung

Zur Bewertung der TCF7L2-Expression während der Myelinisierung in Mäusen, wurden jeweils drei Tiere im Alter von 10 Tagen (P10), 21 Tagen (P21) und 10 Wochen (adult) perfundiert und koronare Schnitte des Gehirns angefertigt. Der Myelinisierungsgrad des *Corpus callosum* wurde mittels einer immunhistochemischen MBP-Färbung und anschließender semiquantitativen Bewertung (0-4) bestimmt (Abb. 22a). Die Bestimmung der TCF7L2⁺ Zellen erfolgte durch immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen murines TCF7L2⁺. In den P10 Mäusen hat die Myelinisierung bereits begonnen (fleckiges Myelin (Abb. 22b)). In P21 Mäusen war die Myelinisierung weiter fortgeschritten (flächiges Myelin/ vollständig myelinisiert). Schließlich war in den adulten Mäusen die Myelinisierung abgeschlossen und das *Corpus callosum* vollständig myelinisiert (Abb. 22c). Bei der Auswertung der TCF7L2-Färbung (Abb. 22d) ist zu erkennen, dass die TCF7L2-Expression ein Maximum in den P10 Tieren zeigt (Abb. 22e) und im Vergleich dazu in den adulten Tieren abnimmt (Abb. 22f). Die Doppelfärbungen gegen TCF7L2 und NOGO-A, einem Marker für reife Oligodendrozyten, zeigen zu Beginn der Myelinisierung nur wenige TCF7L2⁺ Zel-

len, die auch NOGO-A exprimieren (NOGO-A⁺). Im Laufe der Entwicklung nimmt mit Abnahme der TCF7L2⁺ Zellen der Prozentsatz der NOGOA⁺ Zellen unter den TCF7L2⁺ zu, bis schließlich fast alle der wenigen TCF7L2⁺ Zellen auch NOGO-A⁺ sind (Abb. 22g).

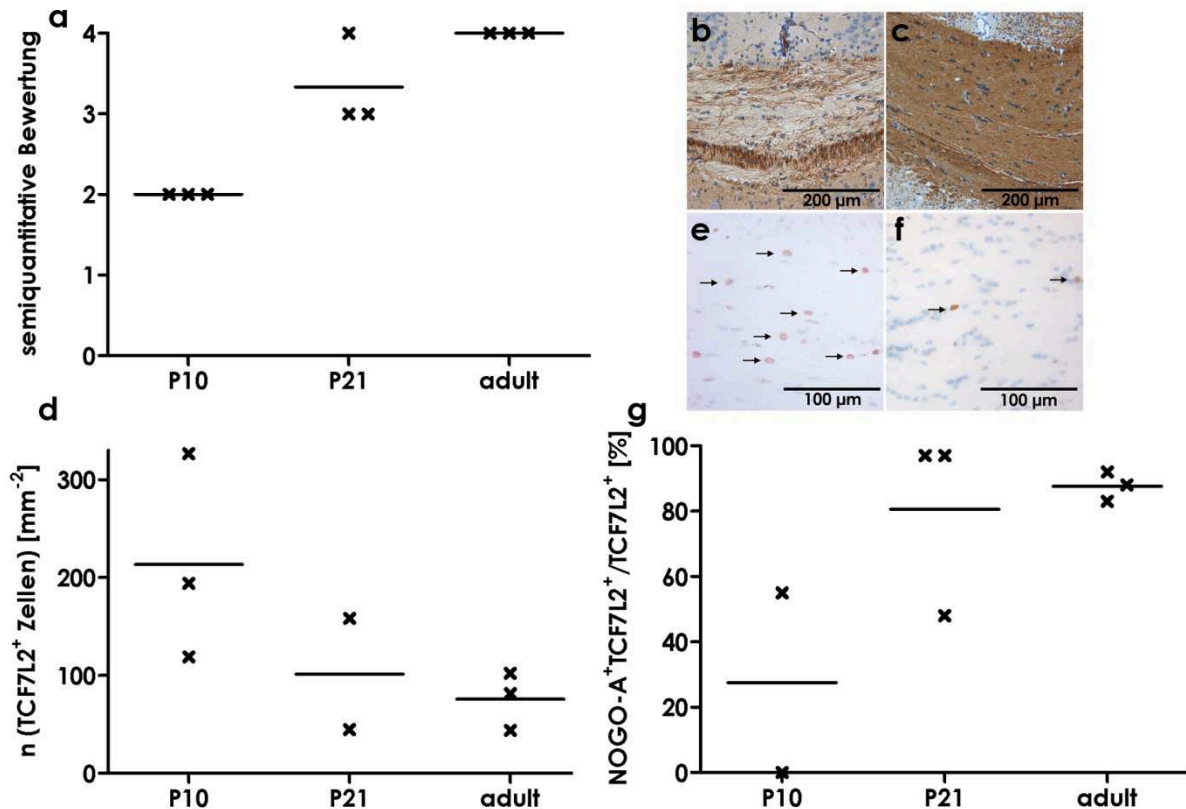


Abb. 22: TCF7L2 Expression während der murinen Myelinisierung. Bereits an Tag 10 ist das *Corpus callosum* teilweise myelinisiert. An Tag 21 ist die Myelinisierung des *Corpus callosum* weiter fortgeschritten und in der adulten Maus abgeschlossen (a), wie die Bilder der MBP-Färbung im *Corpus callosum* einer 10 Tage alten Maus (b) und einer adulten Maus (c) beispielhaft zeigen. Die gleichen Tiere zeigen mit Zunahme der Myelinisierung eine abnehmende Anzahl an TCF7L2⁺ Zellen (d). Die Abnahme der TCF7L2⁺ Zellen (Pfeile) ist beispielhaft in den TCF7L2⁺ Färbungen einer 10 Tage alten (e) und einer adulten (f) Maus dargestellt. Die Anzahl der NOGOA⁺ Zellen unter den TCF7L2⁺ nimmt mit zunehmender Myelinisierung zu (g).

3.7 TCF7L2 in der Remyelinisierung der Maus

Zur Untersuchung der TCF7L2-Expression während der Remyelinisierung in Mäusen wurde auf das Cuprizonmodell zurückgegriffen. Mäuse wurden für 10, 21 und 42 Tage mit 0,3 % Cuprizon gefüttert. Um die TCF7L2-Expression während der Remyelinisierung zu untersuchen, erhielt eine weitere experimentelle Gruppe 0,3 %iges Cuprizonfutter für 42 Tage; die Tiere wurden 10 Tage nach Ende der Cuprizondiät getötet. Als Kontrolle (0 Tage) dienten adulte Mäuse. Alle Tiere wurden transkardial perfundiert und koronare Schnitte der Gehirne angefertigt. Es wurden immunhistochemische Färbungen gegen NOGO-A und TCF7L2 sowie eine Doppelfärbung mit beiden Antikörpern durchgeführt. Die Färbung gegen den oligodendroglialen Marker NOGO-A, der von myelinisierenden Oligodendrozyten exprimiert wird, zeigt, dass im Verlauf der Cuprizonbehandlung ein Minimum an myelinisierenden Oligodendrozyten an den Tagen 10 und 21 zu beobachten ist. An Tag 42, mit Absetzen des Cuprizons, steigt die Zahl der myelinisierenden Oligodendrozyten wieder an und erreicht 10 Tage nach Absetzen des Cuprizons wieder den ursprünglichen Level (Abb. 23a). Das Maximum an TCF7L2⁺ Zellen ist an Tag 42 zu erkennen, 10 Tage später ist die Anzahl der TCF7L2⁺ Zellen vergleichbar mit den Kontrolltieren (Abb. 23b). Dies deutet daraufhin, dass die TCF7L2-Expression nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der oligodendroglialen Differenzierung vorkommt. Eine durchgeführte NOGO-A/TCF7L2 Doppelfärbung zeigte, dass ein Großteil der TCF7L2⁺ auch NOGO-A exprimiert.

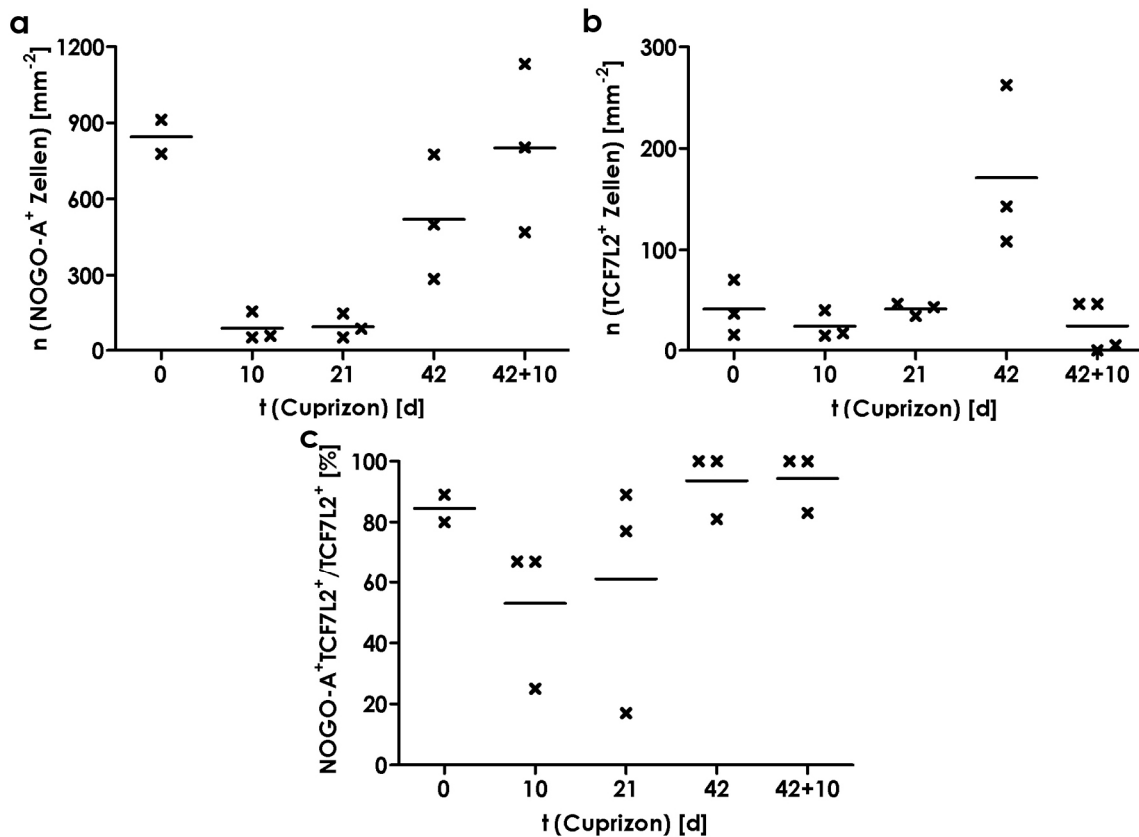


Abb. 23: TCF7L2-Expression während der murinen Remyelinisierung. Nach 10 und 21 Tage Cuprizondiät war die Menge an NOGO-A⁺ Zellen stark reduziert. An Tag 42 stieg sie wieder an und hatte sich 10 Tage nach Absetzen des Cuprizons nahezu vollständig erholt (a). Eine erhöhte Anzahl an TCF7L2⁺ Zellen war nur an Tag 42 zu beobachten, während zu den restlichen Zeitpunkten nur vereinzelte Zellen TCF7L2 exprimierten (b). Über den gesamten Verlauf war die Mehrheit der TCF7L2⁺ Zellen auch NOGO-A⁺ (c).

3.8 TCF7L2 in der humanen Myelinisierung

Um beurteilen zu können, ob der Verlauf der TCF7L2-Expression in der Entwicklung des Menschen dem der Maus ähnelt, wurde eine Reihe von Schnitten aus den Kleinhirnen und Frontalpolen von Föten (32. - 40. Schwangerschaftswoche (SSW)), Säuglingen und Kleinkindern (0 – 48 Monate) gefärbt. Alle Präparate wiesen keine Auffälligkeiten auf und zeigten eine dem Alter entsprechende Morphologie. Es wurden sowohl TCF7L2- als auch MBP-Färbungen durchgeführt. Die MBP-Färbung wurde zur Bestimmung des Myelinisierungsgrades semi-quantitativ bewertet. Die TCF7L2-Färbung sowie eine ebenfalls durchgeführte TCF7L2/NOGO-A-Doppelfärbungen wurden ausgezählt.

Das Kleinhirngewebe zeigte bereits in den Föten der SSW 32 eine beginnende Myelinisierung (Daten nicht abgebildet). Für die weiteren Untersuchungen wurden nur noch die Gewebeproben aus den Frontalpolen herangezogen, in

denen die Myelinisierung mit der Geburt einsetzte und in den Monaten 7 - 12 nach der Geburt weitgehend vollständig war (Abb. 24a). Die durchgeführten TCF7L2-Färbungen zeigten, dass die Expression von TCF7L2 zwischen der 36. und 40. SSW beginnt und ein Maximum in den Monaten 7 – 12 erreicht (Abb. 24e). In adulten Kontrollen (Daten nicht abgebildet) durchgeführte TCF7L2-Färbungen zeigten, wie die Färbungen der Frontallappen aus den Kleinkindern ab Monat 37 (Abb. 24e), nur vereinzelt TCF7L2⁺ Zellen. In den durchgeführten TCF7L2/NOGO-A-Doppelfärbungen waren 50–100 % der TCF7L2⁺ Zellen auch NOGO-A⁺ (Abb. 24f). Um festzustellen ob TCF7L2 während der Entwicklung auch in Astrozyten exprimiert wird, wurden ebenfalls TCF7L2/GFAP-Doppelfärbungen durchgeführt. In diesen konnte keine doppelpositive Zelle gefunden werden (Abb. 24h). Somit scheint auch in der humanen Entwicklung TCF7L2 nur während eines bestimmten Zeitraums der oligodendroglialen Differenzierung exprimiert zu werden.

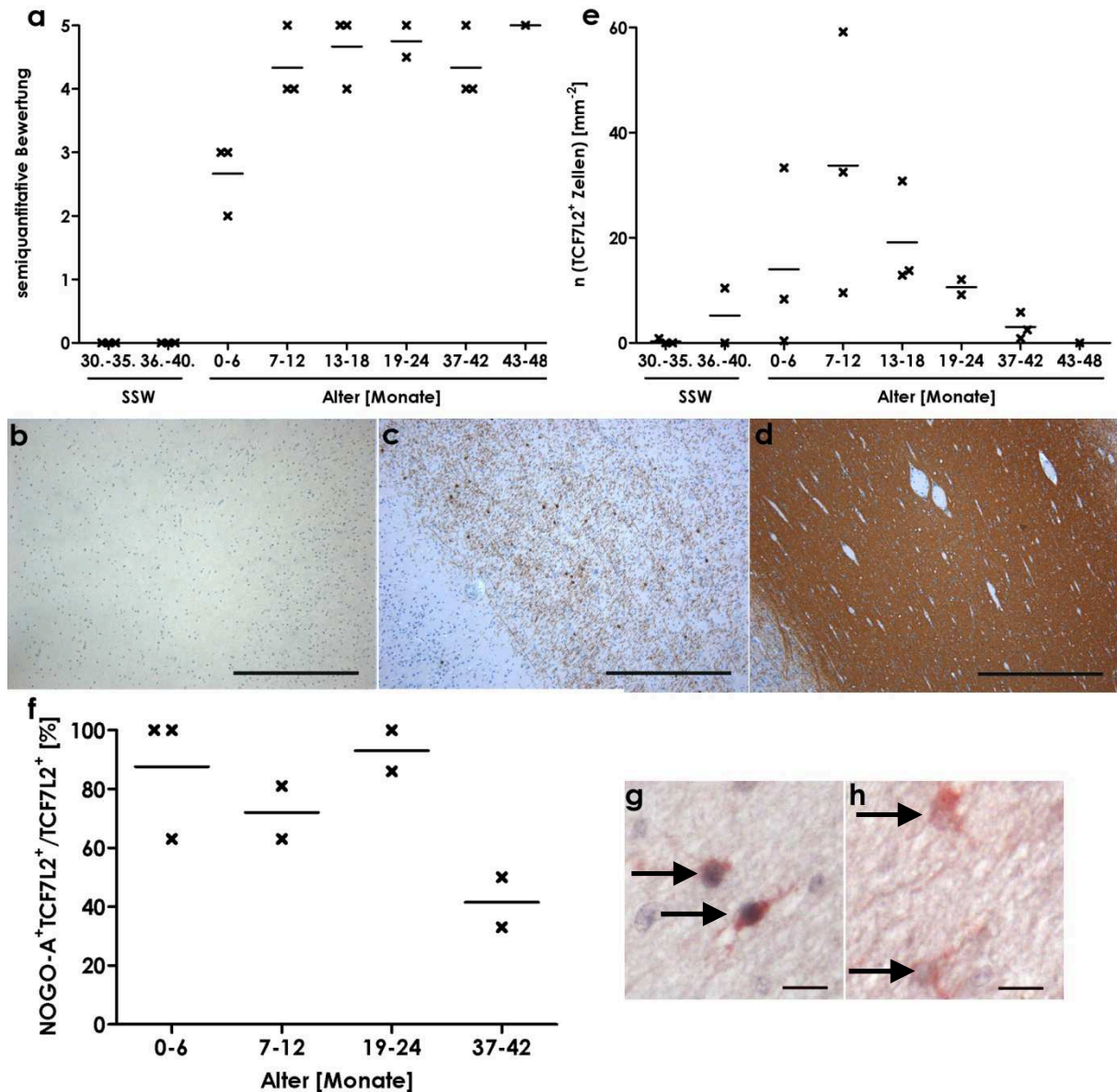


Abb. 24: TCF7L2-Expression während der Myelinisierung in der humanen Entwicklung. Die Myelinisierung des Frontalpol beginnt mit der Geburt und ist nach 12 Monaten größtenteils abgeschlossen (a). Im Frontalpol eines Fetus aus der 35. SSW konnte immunhistologisch kein MBP nachgewiesen werden: semiquantitativer (sq.) MBP-Wert 0 (b). In MBP-Färbungen der gleichen anatomischen Lokalisation eines 2 Monate alten Säuglings ist das sich bildende Myelin gut zu erkennen; sq. MBP-Wert 2 (c). In einem 37 Monate alten Kleinkind ist das untersuchte Areal der weißen Substanz komplett myelinisiert; sq. MBP-Wert 5 (d). Mit der Geburt setzt auch die TCF7L2-Expression im Frontalpol ein und nimmt mit zunehmender Myelinisierung wieder ab (e). In durchgeführten NOGO-A/TCF7L2-Doppelfärbungen zeigten die Mehrzahl der TCF7L2⁺ Zellen auch eine Expression des oligodendrogialen Markers NOGO-A (f, g). In GFAP/TCF7L2-Doppelfärbungen konnten jedoch keine TCF7L2⁺ Zellen mit GFAP-Expression nachgewiesen werden (h).

3.9 HDAC2 und β -Catenin in Myelinisierungsprozessen

Analog zur TCF7L2-Färbung wurden Schnitte derselben Frontalpole mittels eines gegen HDAC2 gerichteten Antikörpers immunhistologisch gefärbt. Die anschließende Auswertung ergab, dass HDAC2 über den gesamten beobachteten Zeitraum exprimiert wird (Abb. 25a). Auf Schnitten von fetalem und adultem Hirngewebe durchgeführte HDAC2/NOGO-A-Doppelfärbungen zeigten HDAC2⁺/NOGO-A⁺ Zellen (Abb. 25c). Dies lässt den Schluss zu, dass HDAC2 von Oligodendrozyten exprimiert wird und im Kern lokalisiert ist.

Initial durchgeführte β -Catenin/NOGO-A Doppelfärbungen auf Schnitten von fetalen Frontalpolen zeigen nukleares β -Catenin in NOGO-A⁺ Zellen (Abb. 25b).

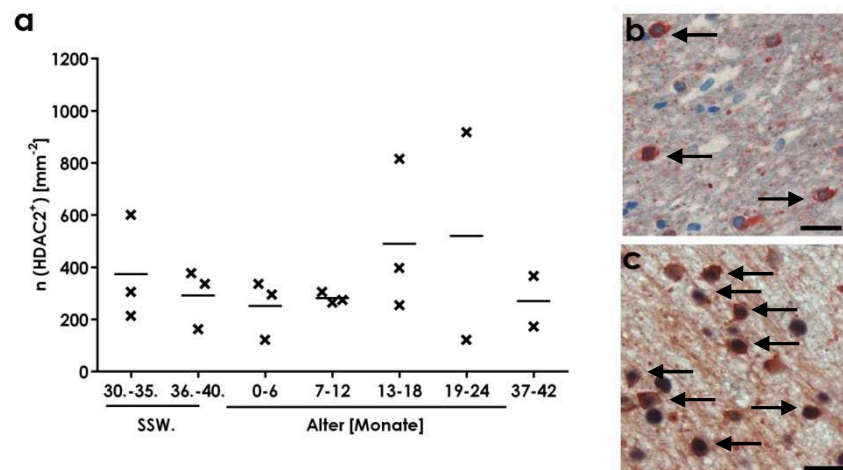


Abb. 25: HDAC2 und β -Catenin in der humanen Entwicklung. HDAC2 wird sowohl im fetalen Frontalpol als auch in den Frontalpolen von Säuglingen und Kleinkindern exprimiert (a). In NOGO-A/HDAC2-Doppelfärbungen treten in fetalem wie auch adulten Hirngewebe sowohl HDAC2⁺ als auch HDAC2⁻ Oligodendrozyten (NOGO-A⁺) auf (c). Im Schnitt eines fetalen Frontalkortex konnten sehr vereinzelt Oligodendrozyten mit nukleärem β -Catenin immunhistologisch nachgewiesen werden (b).

4. Diskussion

4.1 Identifikation von Kandidatengenen für den oligodendroglialen Zelltod im Cuprizonmodell

Das Cuprizonmodell ist ein häufig genutztes Tiermodell zur Untersuchung von Remyelinisierungsprozessen. Obwohl es schon seit den 1970er Jahren genutzt wird, sind die zugrundeliegenden Prozesse des oligodendroglialen Zelltods in diesem Modell nur unvollständig verstanden (Blakemore, 1972; Kipp et al., 2009). Gleiches gilt für den oligodendroglialen Zelltod in demyelinisierenden Erkrankungen wie MS. Das Cuprizonmodell bildet die Komplexität der MS nur unvollständig ab, aber einige wichtige Merkmale treten in der MS und im Modell auf. Sowohl im Cuprizonmodell als auch in der MS, zeigen sterbende Oligodendrozyten eine typisch apoptotische Morphologie, des Weiteren exprimieren Oligodendrozyten die apoptotischen Faktoren Caspase 3 und Bcl-2 (Coprav et al., 2005; Hesse et al., 2010; Kuhlmann et al., 1999). In dieser Arbeit wurden die Mechanismen untersucht, die zum oligodendroglialen Zelltod führen. Hierzu sind Kandidatengene identifiziert worden.

Im Cuprizonmodell ist der frühe oligodendrogliale Zelltod Caspase 3 vermittelt (Hesse et al., 2010). Daher wurden vorhandene Expressionsdaten (Hesse, 2010) der apoptoseassoziierten Gene mit dem Verlauf aktivierter Caspase 3⁺ (CPP32⁺) Zellen verglichen, um putative Kandidatengene zu identifizieren. Einen entsprechenden Verlauf zeigen die identifizierten Gene *Puma* und *Noxa*, deren Produkte, PUMA und NOXA, der Familie der BH3-only Proteine angehören. Auch die mittels der gleichen RNA durchgeführte qRT-PCR zeigt einen zum Mikroarray ähnlichen Verlauf, mit geringeren relativen Expressionsleveln (Abb. 7). Diese Unterschiede können sowohl in den unterschiedlichen Reverse Transkriptions Kits, die für Mikroarray und qRT-PCR genutzt wurden, als auch einer Degradation durch die zwischenzeitliche Lagerung der RNA, begründet liegen.

Sowohl PUMA als auch NOXA können im intrinsischen Signalweg der Apoptose zur Aktivierung von Caspase 3 beitragen und qualifizierten sich somit für weitere Untersuchungen (Kim et al., 2009).

4.2 Genexpression in der oligodendroglialen Zelllinie CG-4 nach Zelltodinduktion

Zur Charakterisierung des oligodendroglialen Zelltods *in vitro* wurden die beiden Zelltodinduktoren Staurosporin und SNAP, die den Zelltod auf unterschiedliche Weise vermitteln, genutzt. Staurosporin vermittelt über die Inhibition einer Vielzahl von Kinasen unter anderem eine Caspase 3 Aktivierung und vermittelt somit Apoptose (Karaman et al., 2008). SNAP ist ein NO-Donor und vermittelt dadurch oxidativen Stress der sowohl zu Nekrose als auch Apoptose führt (Melino et al., 1997).

In vitro zeigt die oligodendrogliale Zelllinie CG-4 nach Inkubation mit zunehmenden Konzentrationen der Zelltodinduktoren Staurosporin und SNAP als Zeichen von zunehmendem Zelltod eine signifikante Abnahme der respiratorischen Aktivität. Mit zunehmenden Konzentrationen von SNAP und Staurosporin steigen auch die mittels qRT-PCR ermittelten relativen Expressionslevel der Kandidatengene *Puma* und *Noxa* (Abb. 8).

Dies ist im Einklang damit, dass der durch Cuprizin und Staurosporin vermittelte oligodendrogliale Zelltod über den mitochondrialen Signalweg vermittelt wird und Caspase 3 abhängig ist (Hesse et al., 2010; Karaman et al., 2008; Palumbo et al., 2012).

Der durch SNAP vermittelte Zelltod beruht hingegen auf der Freisetzung von NO, welches in Zellen Nekrose und Apoptose auslösen kann. NO vermittelt Nekrose über eine Energieverarmung der Zelle, indem es die mitochondriale Respiration und Glykolyse inhibiert (Brown und Borutaite, 2002). Es gibt eine Vielzahl von Mechanismen mit denen NO Apoptose auslösen kann, von denen einer mit der Nitrosylierung von GAPDH beginnt und als ein Resultat in der Aktivierung von p53 mündet. p53 initiiert als Transkriptionsfaktor die Expression von Puma und führt weiter über den intrinsischen Signalweg zur Aktivierung von Caspase 3 und somit Apoptose (Liu et al., 2004; Messmer und Brune, 1996;

Sen et al., 2008) (für ein Review der Mechanismen: (Brown, 2010)). Sowohl nekrotischer als auch apoptotischer Zelltod sind nach SNAPgabe *in vitro* bei Oligodendrozyten beobachtet worden (Jack et al., 2007; Merrill et al., 1993; Mitrovic et al., 1995). Die beobachteten erhöhten Expressionslevel von *Puma* und *Noxa* nach SNAPgabe lassen sich somit durch einen NO vermittelten Anstieg der p53 Expression erklären, da p53 ein Transkriptionsfaktor für *Puma* und *Noxa* ist (Nakano und Vousden, 2001; Oda et al., 2000). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass *Puma*^{-/-} OPCs *in vitro* toleranter gegenüber SNAP und Staurosporin sind (Hagemeier et al., in revision). Es wurde auch gezeigt, dass SNAP Caspase 3 unabhängigen Zelltod in Oligodendrozyten auslösen kann (Benjamins et al., 2003). Dies lässt den Schluss zu, dass auch der SNAP vermittelte oligodendrogliale Zelltod zu einem Teil über den intrinsischen Signalweg der Apoptose vermittelt wird, aber auch Caspase 3 unabhängige Signalwege eine Rolle spielen könnten.

Im Cuprizinmodell ist ab Tag 10 eine Reduktion der CPP32⁺ Zellen bei bestehendem Nachweis von Zellen mit apoptotischer Morphologie zu beobachten (Abb. 7b). Dies legt den Schluss nahe, dass es im Cuprizinmodell auch zur Aktivierung von Caspase 3 unabhängigen Zelltodmechanismen kommt. Auch in Ratten mit fokaler Gehirnschämie wurden Caspase 3 unabhängige Apoptosen beobachtet (Didenko et al., 2002; Hesse et al., 2010). Obwohl Caspase unabhängige Apoptose bzw. Caspase unabhängiger Zelltod häufig beobachtet wird, ist kein einheitlicher Mechanismus beschrieben. Für diese Caspase unabhängigen, Apoptose ähnlichen Formen des Zelltods wird unter anderem ein TNF α abhängiger Mechanismus diskutiert (Álvarez et al., 2011). Eine weitere Möglichkeit ist die Freisetzung von mitochondrialen Faktoren wie AIF nach der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran durch Faktoren des intrinsischen Signalwegs der Apoptose, wie BAX, BAK, PUMA, NOXA, etc (Susin et al., 1999)(Reviews: (Kroemer und Martin, 2005; Leist und Jäätelä, 2001; Martin et al., 2012)).

Die *in vitro* Expressionsdaten decken sich mit den *in vivo* Daten und unterstützen die Vermutung, dass die Kandidatengene *Puma* und *Noxa* eine Rolle im oligodendroglialen Zelltod spielen.

4.3 Rolle von PUMA im cuprizoninduzierten Zelltod

Das pro-apoptotische BH3-only Protein PUMA wurde bereits in mehreren Arbeiten als potenter Vermittler von apoptotischem Zelltod charakterisiert. In einem ALS-Modell der Maus steigerte sich in *Puma*^{-/-} Mäusen die Überlebensrate der Motorneurone und der Krankheitsbeginn verzögerte sich (Kieran et al., 2007). Ebenso war der neuronale Zelltod in neugeborenen Mäusen nach Ethanolgabe in *Puma*^{-/-} Mäusen verringert (Ghosh et al., 2009). Patienten mit malignen Melanomen, die eine schwache *Puma*expression und gesteigerte Mengen von phosphorylierter Proteinase B (p-Akt) in ihren Melanomen aufweisen, haben eine schlechtere Fünfjahresprognose (Karst et al., 2006).

Die in dieser Arbeit gezeigten *Puma*expressionen während des oligodendroglialen Zelltods *in vivo* und *in vitro* führten zu der Annahme, dass PUMA eine Rolle beim oligodendroglialen Zelltod spielt. Dies wurde durch zusätzliche Experimente mit *Puma*^{-/-} Mäusen untersucht.

Die zunächst durchgeführten qRT-PCR Analysen zeigen, dass an Tag 6 der Cuprizondiät die mRNA-Level der Myelogene *Mag*, *Mbp* und *Plp* im *Corpus callosum* von *Puma*^{+/+} Mäusen gegenüber ihren *Puma*^{-/-} Geschwistertieren signifikant erniedrigt sind (Abb. 9). Für C57BL/6 Mäuse wurde vielfach gezeigt, dass es bereits vor der Demyelinisierung zu oligodendroglialem Zelltod und als Folge davon zu verringerter Expression von Myelinen kommt (Hesse et al., 2010; Jurevics et al., 2002; Matsushima und Morell, 2001; Morell et al., 1998), so dass eine mögliche Erklärung für die höheren Expressionslevel der Myelogene in *Puma*^{-/-} Mäusen eine verringerte oligodendrogliale Zellschädigung ist. Die histologischen Untersuchungen an *Puma*^{-/-} und *Puma*^{+/+} Mäusen nach Cuprizongabe in dieser Arbeit bestätigen diese Theorie. Sowohl in der HE-Färbung als auch in der CPP32-Färbung sind in *Puma*^{-/-} Mäusen keine oder nur vereinzelte apoptotische Zellen zu finden, während *Puma*^{+/+} Mäuse den bereits für C57BL/6 Mäuse beschriebenen Verlauf zeigen (Hesse et al., 2010; Mason et al., 2000) (Abb. 13a, c). Auch die durchgeführten OLIG2-Färbungen weisen im *Corpus callosum* über den gesamten Zeitraum der Cuprizongabe mehr oligodendrogliale Zellen (OLIG2⁺) in *Puma*^{-/-} Mäusen als in *Puma*^{+/+} Mäusen auf (Abb. 13e). Der bereits ab Tag 10 in *Puma*^{+/+} Mäusen zu beobachten-

de Anstieg der OLIG2⁺ Zellen ist mit einem Einstrom von oligodendroglialen Vorläuferzellen, die bereits OLIG2 exprimieren zu erklären. Diese differenzieren im weiteren Verlauf aus und remyelinisieren demyelinisierte Axone (Hesse et al., 2010; Matsushima und Morell, 2001).

Die hier gezeigten Daten identifizieren PUMA als einen zentralen Faktor im oligodendroglialen Zelltod des Cuprizonmodells. Dies wird durch weitere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt, die zeigen, dass aus *Puma*^{-/-} Mäusen extrahierte oligodendrogliale Vorläuferzellen *in vitro* unter Standardbedingungen länger überleben und eine höhere Resistenz gegenüber Stauroporin und SNAP vermittelten Zelltod haben als oligodendrogliale Vorläuferzellen aus *Puma*^{+/+} Mäusen (Hagemeier et al., in revision).

Mäuse, die für die Apoptose-assoziierten Faktoren p75(NTR), Fas oder Xiap defizient sind, weisen hingegen verglichen mit Wildtyp-Tieren keinen Unterschied im Ausmaß und Effekt des oligodendroglialen Zelltods im Cuprizonmodell auf (Copray et al., 2005; Hesse et al., 2010; Rena et al., 2012), während TNFα^{-/-} Mäuse im Cuprizonmodell eine verzögerte De- und Remyelinisierung verglichen mit Wildtyp-Tieren zeigen (Arnett et al., 2001). Betrachtet man die hier gezeigten Ergebnisse zusammen mit dem Ergebnis, dass p53^{-/-} Mäuse wie auch mit dem p53-Inhibitor Pifithrinα behandelte Mäuse im Cuprizonmodell verringerten Zelltod aufweisen (Li et al., 2008), ergibt sich, dass der oligodendrogliale Zelltod im Cuprizonmodell vermutlich über den intrinsischen Signalweg der Apoptose via p53 vermittelt wird. P53 sorgt über die Hochregulation seines Zielgens *Puma* zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von pro- und antiapoptotischen Faktoren zu Gunsten der proapoptotischen am Mitochondrium und schließlich zur Apoptose. Dieser Signalweg unterscheidet das Cuprizonmodell vom Modell der EAE in der der oligodendrogliale Zelltod über den extrinsischen Signalweg der Apoptose vermittelt wird (Hovelmeyer et al., 2005).

Die hier im Cuprizonmodell und *in vivo* erbrachten Daten können nicht direkt auf die MS übertragen werden, jedoch zeigten erste IHC-Färbungen an MS-Gewebe PUMA exprimierende Oligodendrozyten in Läsionen (Hagemeier et al., in revision), so dass eine Rolle von PUMA bei der MS nicht ausgeschlossen

ist. Für die weitere Untersuchung dieses Einflusses ist weitere Forschung nötig. Sollte sich eine zentrale Rolle für PUMA auch im oligodendroglialen Zelltod der MS bestätigen, wären Puma-Inhibitoren eine Therapieperspektive für MS-Patienten. Bereits entwickelte Inhibitoren zeigen in präklinischen Studien eine gute Wirksamkeit bei der Inhibierung von PUMA abhängiger Apoptose und auch der Verringerung von Apoptosen nach Bestrahlung. Die verwendeten niedermolekularen Verbindungen sind so designt, dass sie die Interaktion von Puma mit seinen Bindungspartnern verhindern, indem sie die Bindungsstellen des Proteins besetzen (Mustata et al., 2010). Solche putativen Medikamente könnten in der MS aber auch zum Überleben von T-Zellen führen, was wiederum zur Verstärkung der Entzündungsreaktion führen würde. Dies gilt es durch geeignete Modifikationen zu verhindern.

4.3.1 Aktivierung der Mikroglia

Mikroglia sind die Immunzellen des ZNS. Sie phagozytieren, präsentieren Antigene und sekretieren immunregulatorische Proteine (Kim und de Vellis, 2005). In MS und im Cuprizonmodell werden aktivierte Mikroglia gefunden, sie phagozytieren apoptotische Zellen und Myelinüberreste und können so die Remyelinisierung ermöglichen (Olah et al., 2012; Zhang et al., 2011). Mikroglia sind aber in MS zusammen mit aus dem Blut stammenden Makrophagen zentrale Bestandteile des Pathomechanismus, da sie über die Sekretion verschiedener pro-inflammatorischer Stoffe Entzündungsreaktionen vermitteln (Lassmann und van Horssen, 2011). Ob der neuroprotektive Einfluss der Mikroglia den entzündungsfördernden und somit mittelbar axonschädigenden Einfluss überwiegt oder umgekehrt, wird diskutiert (Napoli und Neumann, 2010).

Die hier untersuchte Aktivierung der Makrophagen/ Mikroglia im Cuprizonmodell weist Unterschiede zwischen *Puma*^{-/-} und *Puma*^{+/+} Mäusen auf. Bei den MAC3⁺ Zellen im *Corpus callosum* handelt es sich im Cuprizonmodell zu > 99 % um aktivierte Mikroglia (Remington et al., 2007). Aktivierte Mikroglia phagozytieren im *Corpus callosum* während der Cuprizongabe Myelinüberreste und Zelltrümmer (Olah et al., 2012). Die beobachtete geringere Aktivierung der Mikroglia im *Corpus callosum* von *Puma*^{-/-} Mäusen (Abb. 15) kann zurückge-

führt werden auf die geringere Menge an apoptotischen Körpern und Myelinüberresten. Es ist jedoch auch möglich, dass die Mikroglia wegen der *Puma*-Defizienz eine verminderte Aktivierung zeigen. Dies würde auch zu einer verminderten Sekretion von pro-inflammatorischen Faktoren wie TNF α führen. In TNF α ^{-/-} Mäusen kommt es im Cuprizonmodell zunächst zu weniger oligodendroglialem Zelltod (Arnett et al., 2001), was auf eine verringerte Aktivierung der Mikroglia zurückgeführt wurde.

Die gefundenen Unterschiede in den Expressionsleveln der Entzündungsmarker *in vitro* (Abb. 16) deuten auf eine geringere Aktivierbarkeit der *Puma*^{-/-} Mikroglia hin. In der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Luisa Klotz wurde zusätzlich der Anteil der TNF α exprimierenden Zellen in einer fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie (FACS, engl.: *fluorescence activated cell sorting*) nach Aktivierung bestimmt. In dieser zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Hagemeyer et al., in revision). In Zusammenschau mit der deutlichen Reduktion des spontanen oder induzierten Zelltodes von *Puma*^{-/-} im Vergleich zu *Puma*^{+/+} Oligodendrozyten erscheint es somit wahrscheinlicher, dass die verminderte Aktivierung der Mikroglia auf den verminderten oligodendroglialen Zelltod zurückzuführen ist. Um die funktionelle Rolle von Puma für die Mikroglia-Aktivierung weiter abzuklären, sind zusätzliche Experimente wünschenswert, wie z.B. die Untersuchung der Mikroglia-Aktivierung in konditionellen *Puma*-Knockout-Mäusen.

4.4 Rolle von NOXA im cuprizoninduzierten Zelltod

Auch das BH3-only Protein NOXA ist pro-apoptotisch und vermittelt diesen Effekt wie PUMA ebenfalls durch Hemmung eines anti-apoptotischen Bcl2-Proteins am Mitochondrium. Anders als PUMA kann es nur mit einem anti-apoptotischen Protein, MCL1, interagieren (Chen et al., 2005; Kuwana et al., 2005). Trotz der limitierten Funktion ist in *Noxa*^{-/-} Mäusen der Zelltod von Motorneuronen nach Axotomie verringert (Kiryu-Seo et al., 2005). Ferner zeigen *Noxa*^{-/-} MEFs *in vitro* unter verschiedenen apoptotischen Stimuli weniger Apoptosen als *Noxa*^{+/+} MEFs (Shibue et al., 2003). Auch *in vivo* findet man in mit γ -Strahlen bestrahlten *Noxa*^{-/-} Mäusen weniger apoptotische Stammzellen in

den Darmkrypten (Shibue et al., 2003). Weitere Beobachtungen zeigen, dass Leukoblastomzellen *in vitro* nach Glukokortikoidgabe (eine Chemotherapieoption bei akuter lymphatischer Leukämie) mehr Apoptosen zeigen, wenn ihre paradoxerweise durch das Glukokortikoid induzierte Noxadegeneration durch konditionale Expression von transgenem Noxa aufgefangen wird (Ploner et al., 2009).

Wie für *Puma* wurde in der vorliegenden Arbeit für *Noxa* nachgewiesen, dass es nach Cuprizongabe *in vivo* differentiell reguliert wird. *In vitro* wurden diese Ergebnisse in einer oligodendroglialen Zelllinie mittels zwei verschiedener Zelltodinduktoren reproduziert. Wie die *Puma*expression, ist auch die *Noxa*expression durch P53 reguliert, so dass auch NOXA als Zelltod vermittelnder Faktor im Cuprizonmodell in Frage kommt.

Die durchgeführten Experimente zeigen jedoch unter Cuprizongabe über den gesamten Zeitraum keinen gegenüber den *Noxa*^{+/+} Mäusen signifikant verringerten Zelltod in den *Noxa*^{-/-} Mäusen (Abb. 19a, b). Viel mehr zeigen die Auswertungen der HE- und CPP32-Färbungen beider Genotypen den typischen Verlauf der auch in *Puma*^{+/+} Mäusen zu beobachten ist. Gleiches gilt für die Auswertung der OLIG2-Färbungen, die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zeigt (Abb. 19c). Auch die Aktivierung der Mikroglia zeigt in beiden Genotypen während der Cuprizondiät keine signifikanten Unterschiede (Abb. 21).

Die gezeigten Daten lassen eine wichtige Rolle für NOXA im Cuprizonmodell unwahrscheinlich erscheinen. Möglicherweise vermittelt auch NOXA einen Teil des Cuprizon-vermittelten Zelltods, kann diesen jedoch nur über die Bindung von MCL1 vermitteln. Dieser Faktor kann aber ebenfalls von PUMA gebunden werden und den Effekt des *Noxa-knockouts* kompensieren. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in Leukoblastomzellen, in denen es auch nur zu einer Modulation des Zelltods nach Kompensation der Noxadegeneration kommt (Ploner et al., 2009). Wie bereits beschrieben wurde, ist Noxa in vielen Zelltypen an der Apoptose beteiligt, aber das Ausmaß unterscheidet sich von Zelltyp zu Zelltyp. In CD4⁺8⁺ T-Zellen wird die Apoptose auch durch Noxa vermittelt, während es in CD4⁺8⁻ und CD4⁻8⁺ T-Zellen (Michalak et al., 2008) und im

oligodendroglialen Zelltod der toxischen Demyelinisierung wie hier gezeigt, nicht benötigt wird. Die allenfalls geringe Funktion die NOXA im oligodendroglialen Zelltod zu spielen scheint, lässt es für einen Therapieansatz in MS zunächst uninteressant erscheinen.

4.5 TCF7L2 und seine Bindungspartner HDAC2 und β -Catenin in Myelinisierungsprozessen

TCF7L2 ist ein Transkriptionsfaktor der TCF/LEF Transkriptionsfaktor Familie und ist Teil des kanonischen Wnt-Signalwegs (Clevers, 2006; van de Wetering et al., 2002). Es wird vermutet, dass er in der oligodendroglialen Differenzierung an Myelinisierungsprozessen mitwirkt und seine Expression im ZNS auf Zellen mit oligodendroglialer Abstammung beschränkt ist (Fancy et al., 2009). In *Tcf7l2*^{-/-} Mäusen wurde beobachtet, dass es auf Grund fehlender Reifung der OPCs nicht zur Myelinisierung kommt und die Föten perinatal versterben. Auch bei einem konditionalen Knockout von HDAC1/2 in Oligodendrozyten kommt es nicht zur Reifung der OPCs (Ye et al., 2009). Auf diesen Beobachtungen und weiteren tierexperimentellen Untersuchungen beruht ein Modell, das in Abb. 3) skizziert ist und davon ausgeht, dass TCF7L2 die Transkription von Myelingsuppressoren vermittelt, solange es im Kern β -Catenin bindet. Bindet an Stelle des β -Catenins die HDAC1 oder 2 an TCF7L2 kommt es nicht zur Transkription der Supressoren und somit zur Expression der Myelogene (Li und Richardson, 2009; Ye et al., 2009). Es stellt sich die Frage, ob TCF7L2 auch eine ähnliche Rolle bei der humanen Myelinisierung spielt.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die maximale Expression von TCF7L2 während der Myelinisierung des Gehirns von Maus und Mensch auf ein relativ enges Zeitfenster beschränkt ist (Abb. 22, Abb. 24). Dies unterstützt die Annahmen, dass TCF7L2 auch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung humaner Oligodendrozyten spielt. Die Tatsache, dass sowohl NOGOA⁺ als auch NOGOA⁻ TCF7L2 exprimierende Zellen gefunden wurden, legt den Schluss nahe, dass TCF7L2 am Übergang von der späten Vorläuferzelle zum reifen Oligodendrozyten exprimiert wird, denn die in den frühen Phasen der Entwicklung beobachteten TCF7L2⁺ Zellen sind auch oligodendroglialer Herkunft, wie

in unserer Arbeitsgruppe zusätzlich durchgeführte Färbungen zeigen. Diese Untersuchungen sowie die fehlende Kolokalisation mit (GFAP⁺) Astrozyten, bestätigen die Annahme, dass die Expression von TCF7L2 während der Myelinisierung auf Oligodendrozyten beschränkt ist.

Wie hier gezeigt werden konnte, gilt für die Remyelinisierung nach der toxischen Demyelinisierung durch Cuprizon in Mäusen das Gleiche wie für die Myelinisierung während der Entwicklung. Die Expression von TCF7L2 steigt mit der einsetzenden Remyelinisierung an Tag 42 sprunghaft an und ist nach erfolgter Remyelinisierung bereits an Tag 42+10 wieder auf den ursprünglichen Level zurückgefallen (Abb. 23). Auch in der Remyelinisierung fanden wir sowohl reife Oligodendrozyten (NOGOA⁺) als auch unreife Oligodendrozyten (NOGOA⁻), die TCF7L2 exprimierten.

Weitere in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Färbungen an MS-Läsionen, zeigten TCF7L2 exprimierende Oligodendrozyten in remyelinisierenden MS-Läsionen. Hingegen konnte in aktiv demyelinisierenden, demyelinisierten und chronischen MS-Läsionen keine oder nur wenige TCF7L2 exprimierende Oligodendrozyten gefunden werden. Jedoch wurden ebenfalls TCF7L2 exprimierende Zellen in entzündlichen, nicht-demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS gefunden. Darüber hinaus wurden TCF7L2⁺ Astrozyten bei demyelinisierenden und entzündlichen Erkrankungen des ZNS gefunden (Lürbke et al., in preparation).

HDAC2 ist ubiquitär in den Kernen von Oligodendrozyten während der Myelinisierung, im bestehenden Myelin sowie während der Remyelinisierung exprimiert, während β -Catenin nur in wenigen Zellen nukleär lokalisiert werden konnte. Somit konnten in unseren bisherigen Untersuchungen eine möglicherweise inhibierende Wirkung von β -Catenin auf die Myelinisierung nicht belegt werden. Allerdings sind immunhistochemische Methoden zur Detektion von nukleärem β -Catenin relativ unsensitiv. Mit dieser Methode können zwar hohe β -Catenin-Level, wie z.B. in humanen Tumoren (z.B. Kraniopharyngeom (Takei und Powell, 2010)) detektiert werden, nicht jedoch notwendigerweise physiologische β -Catenin-Level, wie sie z.B. während der Entwicklung vorlie-

gen. Daher sind weitere Untersuchungen wie zum Beispiel Western Blot-Analysen nach differentieller Zentrifugation und ein Nachweis in der Kernfraktion nötig.

Zusammengenommen unterstützen diese Ergebnisse die Überlegung, dass TCF7L2 in Myelinisierungsprozessen von großer Wichtigkeit ist, allerdings scheint TCF7L2 nicht auf die (Re-)Myelinisierung beschränkt zu sein, da auch in nicht-demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS TCF7L2⁺ Oligodendrozyten nachgewiesen werden konnten. Auch wird TCF7L2 nicht wie zuvor angenommen im ZNS nur von Oligodendrozyten (Fancy et al., 2009), sondern auch von Astrozyten exprimiert.

Literaturverzeichnis

Akhtar RS, Geng Y, Klocke BJ, Latham CB, Villunger A, Michalak EM, Strasser A, Carroll SL, Roth KA (2006) BH3-only proapoptotic Bcl-2 family members Noxa and Puma mediate neural precursor cell death. *J Neurosci* 26:7257-7264.

Álvarez S, Blanco A, Fresno M, Muñoz-Fernández MÁ (2011) TNF- α contributes to Caspase-3 Independent Apoptosis in Neuroblastoma Cells: Role of NFAT. *PLoS ONE* 6:e16100.

Anekonda TS, Reddy PH (2006) Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96:305-313.

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

Banwell B, et al. (2007) Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 6:773-781.

Baranzini SE, et al. (2010) Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature* 464:1351-1356.

Barnett MH, Henderson AP, Prineas JW (2006) The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult Scler* 12:121-132.

Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55:458-468.

Benjamins JA, Nedelkoska L, George EB (2003) Protection of Mature Oligodendrocytes by Inhibitors of Caspases and Calpains. *Neurochemical Research* 28:143-152.

Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303:474-482.

Blakemore WF (1972) Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol* 1:413-426.

- Blakemore WF (1981) Observations on myelination and remyelination in the central nervous system. In: *Development in the Nervous System* (Garrod DR, Feldman JD, eds), pp 289-301. Cambridge: Cambridge University Press.
- Brown GC, Borutaite V (2002) Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 33:1440-1450.
- Brown GC (2010) Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23:153-165.
- Burton PR, et al. (2007) Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 39:1329-1337.
- Carlton WW (1967) Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci* 6:11-19.
- Castrop J, van NK, Clevers H (1992) A gene family of HMG-box transcription factors with homology to TCF-1. *Nucleic Acids Res* 20:611.
- Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002) Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346:165-173.
- Charcot J-M (1868) *Histologie de la Sclérose en plaques. Comptes rendus des séances et mémoires lus à la société de Biologie.*
- Chen JW, Murphy TL, Willingham MC, Pastan I, August JT (1985) Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J Cell Biol* 101:85-95.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17:393-403.
- Chipuk JE, Green DR (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18:157-164.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37:299-310.
- Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.
- Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3:339-345.
- Copray JC, Kust BM, Mantingh-Otter I, Boddeke HW (2005) p75NTR independent oligodendrocyte death in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:600-609.

- D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP (1996) Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 184:2361-2370.
- De Jager PL, et al. (2009a) The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5264-5269.
- De Jager PL, et al. (2009b) Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* 41:776-782.
- Didenko VV, Ngo H, Minchew CL, Boudreaux DJ, Widmayer MA, Baskin DS (2002) Caspase-3-dependent and -independent apoptosis in focal brain ischemia. *Mol Med* 8:347-352.
- Dietz KC, Casaccia P (2010) HDAC inhibitors and neurodegeneration: at the edge between protection and damage. *Pharmacol Res* 62:11-17.
- Eckhardt M (2008) The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* 37:93-103.
- Engel T, Hatazaki S, Tanaka K, Prehn JH, Henshall DC (2010a) Deletion of Puma protects hippocampal neurons in a model of severe status epilepticus. *Neuroscience* 168:443-450.
- Engel T, Murphy BM, Hatazaki S, Jimenez-Mateos EM, Concannon CG, Woods I, Prehn JH, Henshall DC (2010b) Reduced hippocampal damage and epileptic seizures after status epilepticus in mice lacking proapoptotic Puma. *FASEB J* 24:853-861.
- Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342-348.
- Fanarraga ML, Griffiths IR, Zhao M, Duncan ID (1998) Oligodendrocytes are not inherently programmed to myelinate a specific size of axon. *J Comp Neurol* 399:94-100.
- Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, Sanai N, Franklin RJ, Rowitch DH (2009) Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev* 23:1571-1585.
- Fancy SP, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJ, Rowitch DH (2011) Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci* 34:21-43.
- Fancy SP, Zhao C, Franklin RJ (2004) Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* 27:247-254.
- Ffrench-Constant C, Raff MC (1986) Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. *Nature* 319:499-502.

- Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460:587-591.
- Fraher JP (1973) A quantitative study of anterior root fibres during early myelination. II. Longitudinal variation in sheath thickness and axon circumference. *J Anat* 115:421-444.
- Franklin RJ (2002) Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3:705-714.
- Franklin RJ, French-Constant C (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9:839-855.
- Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP (2010) Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci* 30:16938-16948.
- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002) Cloning and Functional Characterization of HDAC11, a Novel Member of the Human Histone Deacetylase Family. *Journal of Biological Chemistry* 277:25748-25755.
- Geurts JJ, Bo L, Pouwels PJ, Castelijns JA, Polman CH, Barkhof F (2005) Cortical lesions in multiple sclerosis: combined postmortem MR imaging and histopathology. *AJNR Am J Neuroradiol* 26:572-577.
- Ghosh AP, Walls KC, Klocke BJ, Toms R, Strasser A, Roth KA (2009) The proapoptotic BH3-only, Bcl-2 family member, Puma is critical for acute ethanol-induced neuronal apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:747-756.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363:15-23.
- Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T (2009) Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72:1914-1921.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610-1613.
- Groebe A, Clarner T, Baumgartner W, Dang J, Beyer C, Kipp M (2009) Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrogliosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum* 8:163-174.
- Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL (2007)

Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 357:851-862.

Hagemeier K, Lürbke A, Hucke S, Albrecht S, Preisner A, Klassen E, Hoffmann E, Brück W, Klotz L, Kuhlmann T (in revision) Puma but not noxa is essential for oligodendroglial cell death.

Hammond SR, McLeod JG, Millingen KS, Stewart-Wynne EG, English D, Holland JT, McCall MG (1988) The epidemiology of multiple sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart. *Brain* 111 (Pt 1):1-25.

Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T (2001) Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11318-11323.

Hartline DK, Colman DR (2007) Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol* 17:R29-R35.

Hein T, Hopfenmüller W (2000) [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 71:288-294.

Hershko T, Ginsberg D (2004) Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 279:8627-8634.

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

Hesse AR (2010) Die Rolle der Apoptose beim oligodendroglialen Zelltod in einem demyelinisierenden Tiermodell der Multiplen Sklerose.

Hijikata M, Kato N, Sato T, Kagami Y, Shimotohno K (1990) Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel phorbol-12-myristate-13-acetate-responsive gene that is highly expressed in an adult T-cell leukemia cell line. *J Virol* 64:4632-4639.

Hoffmann K, Lindner M, Groticke I, Stangel M, Loscher W (2008) Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Exp Neurol* 210:308-321.

Hovelmeyer N, Hao Z, Kranidioti K, Kassiotis G, Buch T, Frommer F, von HL, Kramer D, Minichiello L, Kollias G, Lassmann H, Waisman A (2005) Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 175:5875-5884.

IMSGC (2009a) Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* 41:824-828.

- IMSGC (2009b) The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes. *Genes Immun* 10:11-14.
- IMSGC (2010a) Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 19:953-962.
- IMSGC (2010b) IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Genes Immun* 11:397-405.
- Irvine KA, Blakemore WF (2008) Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain* 131:1464-1477.
- Jack C, Antel J, Bruck W, Kuhlmann T (2007) Contrasting potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis. *Glia* 55:926-934.
- Jakkula E, et al. (2010) Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. *Am J Hum Genet* 86:285-291.
- Jeffery ND, Blakemore WF (1997) Locomotor deficits induced by experimental spinal cord demyelination are abolished by spontaneous remyelination. *Brain* 120 (Pt 1):27-37.
- Jersild C, Svejgaard A, Fog T (1972) HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1:1240-1241.
- Jurevics H, Largent C, Hostettler J, Sammond DW, Matsushima GK, Kleindienst A, Toews AD, Morell P (2002) Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *J Neurochem* 82:126-136.
- Kampman MT, Brustad M (2008) Vitamin D: a candidate for the environmental effect in multiple sclerosis - observations from Norway. *Neuroepidemiology* 30:140-146.
- Karaman MW, et al. (2008) A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotech* 26:127-132.
- Karst AM, Dai DL, Cheng JQ, Li G (2006) Role of p53 up-regulated modulator of apoptosis and phosphorylated Akt in melanoma cell growth, apoptosis, and patient survival. *Cancer Res* 66:9221-9226.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Khochbin S, Verdel A, Lemercier C, Seigneurin-Berny D (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* 11:162-166.

- Kieran D, Woods I, Villunger A, Strasser A, Prehn JH (2007) Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20606-20611.
- Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH (2009) Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 36:487-499.
- Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH (2004) BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med* 199:113-124.
- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313.
- Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009) The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol* 118:723-736.
- Kiryu-Seo S, Hirayama T, Kato R, Kiyama H (2005) Noxa is a critical mediator of p53-dependent motor neuron death after nerve injury in adult mouse. *J Neurosci* 25:1442-1447.
- Koch-Henriksen N, Sorensen PS (2010) The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9:520-532.
- Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H (2000) Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 157:267-276.
- Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11:725-730.
- Kuhlmann T, Lucchinetti C, Zettl UK, Bitsch A, Lassmann H, Bruck W (1999) Bcl-2-expressing oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Glia* 28:34-39.
- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W (2008) Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131:1749-1758.
- Kurtzke JF (1980) Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand* 62:65-80.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17:525-535.

Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111:331-342.

Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA (2003) Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33:366-374.

Lassmann H, van Horssen J (2011) The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585:3715-3723.

Leist M, Jäätelä M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:589-598.

Letai A (2009) Puma strikes Bax. *J Cell Biol* 185:189-191.

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2:183-192.

Li H, Richardson WD (2009) Genetics meets epigenetics: HDACs and Wnt signaling in myelin development and regeneration. *Nat Neurosci* 12:815-817.

Li J, Ghiani CA, Kim JY, Liu A, Sandoval J, DeVellis J, Casaccia-Bonnel P (2008) Inhibition of p53 transcriptional activity: a potential target for future development of therapeutic strategies for primary demyelination. *J Neurosci* 28:6118-6127.

Liebetanz D, Merkler D (2006) Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 202:217-224.

Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG, Stamler JS (2004) Essential Roles of S-Nitrosothiols in Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock. *Cell* 116:617-628.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-408.

Louis JC, Magal E, Muir D, Manthorpe M, Varon S (1992) CG-4, a new bipotential glial cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. *J Neurosci Res* 31:193-204.

Lublin FD (2004) Multiple Sclerosis Classification and Overview. In: *Myelin Biology and Disorders* (Le DT, Griffin JW, Lassmann H, Trapp BD, eds), pp 691-699. New York: Academic Press.

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

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

Ludwin SK, Maitland M (1984) Long-term remyelination fails to reconstitute normal thickness of central myelin sheaths. *J Neurol Sci* 64:193-198.

Lürbke A, Preisner A, Cui Q, Hagemeyer K, Brück W, Antel J, Kuhlmann T (in preparation) Absence of β -catenin and limited TCF7L2 expression in MS lesions.

Luthi AU, Martin SJ (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14:641-650.

Martin S, Henry C, Cullen S (2012) A Perspective on Mammalian Caspases as Positive and Negative Regulators of Inflammation. *Molecular Cell* 46:387-397.

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

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

Matthews PM, De SN, Narayanan S, Francis GS, Wolinsky JS, Antel JP, Arnold DL (1998) Putting magnetic resonance spectroscopy studies in context: axonal damage and disability in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 18:327-336.

McDonald WI, Ohlrich GD (1971) Quantitative anatomical measurements on single isolated fibres from the cat spinal cord. *J Anat* 110:191-202.

Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407:796-801.

Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistic G, Finazzi-Agr A (1997) S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 388:432-433.

Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918.

Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE (1993) Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151:2132-2141.

- Messmer UK, Brune B (1996) Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J* 319 (Pt 1):299-305.
- Michalak EM, Villunger A, Adams JM, Strasser A (2008) In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ* 15:1019-1029.
- Miller JR, Moon RT (1996) Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes & Development* 10:2527-2539.
- Mitrovic B, Ignarro LJ, Vinters HV, Akers MA, Schmid I, Uittenbogaart C, Merrill JE (1995) Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience* 65:531-539.
- Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK (1998) Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci* 12:220-227.
- Mustata G, Li M, Zevola N, Bakan A, Zhang L, Epperly M, Greenberger JS, Yu J, Bahar I (2010) Development of Small-Molecule PUMA Inhibitors for Mitigating Radiation-Induced Cell Death. *Curr Top Med Chem*.
- Nagan N, Zoeller RA (2001) Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* 40:199-229.
- Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI (1972) Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens* 2:1-4.
- Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887-894.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.
- Nakano K, Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694.
- Napoli I, Neumann H (2010) Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 225:24-28.
- Nave KA (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244-252.
- Nishiyama A, Chang A, Trapp BD (1999) NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1113-1124.
- Norton WT, Cammer W (1984) Isolation and characterization of myelin. In: *Myelin* (Morell P, ed), pp 147-180. New York.

Norton WT, Poduslo SE (1973) Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J Neurochem* 21:759-773.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288:1053-1058.

Oksenberg JR, Baranzini SE (2010) Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol* 6:429-437.

Olah M, Amor S, Brouwer N, Vinet J, Eggen B, Biber K, Boddeke HW (2012) Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia* 60:306-321.

Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, Takahashi Y, Masuma R (1977) A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 30:275-282.

Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC (2006) Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 5:932-936.

Palumbo S, Toscano CD, Parente L, Weigert R, Bosetti F (2012) The cyclooxygenase-2 pathway via the PGE2 EP2 receptor contributes to oligodendrocytes apoptosis in cuprizone-induced demyelination. *Journal of Neurochemistry* 121:418-427.

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

Perez-Sala D, Mollinedo F (1995) Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *J Cell Physiol* 163:523-531.

Ploner C, Rainer J, Lobenwein S, Geley S, Kofler R (2009) Repression of the BH3-only molecule PMAIP1/Noxa impairs glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells. *Apoptosis* 14:821-828.

Raine CS (1994) The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* 36 Suppl:S61-S72.

Remington LT, Babcock AA, Zehntner SP, Owens T (2007) Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. *Am J Pathol* 170:1713-1724.

Ren D, Tu HC, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH (2010) BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* 330:1390-1393.

Rena HA, Hagemeyer K, Lurbke A, Held J, Friedman H, Peterson A, Bruck W, Kuhlmann T (2012) XIAP protects oligodendrocytes against cell death in vitro but has no functional role in toxic demyelination. *Glia* 60:271-280.

Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA (1996) Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 119 (Pt 2):449-455.

Sanna S, et al. (2010) Variants within the immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nat Genet* 42:495-497.

Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275:983-986.

Sawcer S, et al. (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214-219.

Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A (2008) Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 10:866-873.

Seo YW, Shin JN, Ko KH, Cha JH, Park JY, Lee BR, Yun CW, Kim YM, Seol Dw, Kim Dw, Yin XM, Kim TH (2003) The Molecular Mechanism of Noxa-induced Mitochondrial Dysfunction in p53-Mediated Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* 278:48292-48299.

Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T, Tanaka N (2003) Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* 17:2233-2238.

Sim FJ, Lang JK, Waldau B, Roy NS, Schwartz TE, Pilcher WH, Chandross KJ, Natesan S, Merrill JE, Goldman SA (2006) Complementary patterns of gene expression by human oligodendrocyte progenitors and their environment predict determinants of progenitor maintenance and differentiation. *Ann Neurol* 59:763-779.

Simons M, Trotter J (2007) Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 17:533-540.

Smith KJ, Blakemore WF, McDonald WI (1979) Central remyelination restores secure conduction. *Nature* 280:395-396.

Spange S, Wagner T, Heinzl T, Kramer OH (2009) Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 41:185-198.

Stoffel W, Bosio A (1997) Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol* 7:654-661.

Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45.

Strasser A (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5:189-200.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.

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

Szegezdi E, FitzGerald U, Samali A (2003) Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 1010:186-194.

Takei H, Powell SZ (2010) Novel immunohistochemical markers in the diagnosis of nonglial tumors of nervous system. *Adv Anat Pathol* 17:150-153.

Taylor DM, Maxwell MM, Luthi-Carter R, Kazantsev AG (2008a) Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases. *Cell Mol Life Sci* 65:4000-4018.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008b) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241.

Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF (2003) Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* 983:84-100.

Toth A, Jeffers JR, Nickson P, Min JY, Morgan JP, Zambetti GP, Erhardt P (2006) Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H52-H60.

Trapp BD, Kidd GJ (2004) Chapter 1 - Structure of the Myelinated Axon. In: *Myelin Biology and Disorders* (Robert AL, John WG, Hans L, Klaus-Armin N, Robert Miller and Bruce, Bruce DT, eds), pp 3-27. San Diego: Academic Press.

van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de LW, Oving I, Hurlstone A, van der HK, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den BM, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002) The beta-

catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111:241-250.

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302:1036-1038.

Wang AH, Yang XJ (2001) Histone deacetylase 4 possesses intrinsic nuclear import and export signals. *Mol Cell Biol* 21:5992-6005.

Waring P, Mullbacher A (1999) Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol* 77:312-317.

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14:2060-2071.

Willer CJ, Dymont DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC (2003) Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12877-12882.

Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC (2007) Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315:856-859.

Wosik K, Antel J, Kuhlmann T, Bruck W, Massie B, Nalbantoglu J (2003) Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. *J Neurochem* 85:635-644.

Wytenbach A, Tolkovsky AM (2006) The BH3-only protein Puma is both necessary and sufficient for neuronal apoptosis induced by DNA damage in sympathetic neurons. *J Neurochem* 96:1213-1226.

Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR (2009) HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci* 12:829-838.

You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW (2006) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* 203:1657-1663.

Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7:673-682.

Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SP, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, Young K, Goncharevich A, Pohl H, Rizzi M, Rowitch DH, Kessler N, Suter U, Richardson WD, Franklin RJ (2010) CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 6:578-590.

Zhang Z, Zhang ZY, Schittenhelm J, Wu Y, Meyermann R, Schluesener HJ (2011) Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *J Neuroimmunol* 237:73-79.

Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15:1481-1486.

Anhang

Tab.: 1 Puma-Tiere

Tier	Genotyp	Geschlecht	Dauer (d)	Alter bei Start (w)	Geburtsdatum	Sterbedatum	Alter bei Tod (d)
X230/10	WT	m	0	10	08.07.2010	13.09.2010	67
X232/10	WT	m	0	8	17.07.2010	13.09.2010	58
X233/10	WT	w	0	10	17.07.2010	27.09.2010	72
X108/11	WT	w	0	8	17.04.2011	14.06.2011	58
X109/11	WT	w	0	8	17.04.2011	14.06.2011	58
X131/11	KO	w	0	10	30.05.2011	08.08.2011	70
X132/11	KO	m	0	9	08.06.2011	08.08.2011	61
X133/11	KO	m	0	9	08.06.2011	08.08.2011	61
X134/11	KO	m	0	8	11.06.2011	08.08.2011	58
X135/11	KO	w	0	8	11.06.2011	08.08.2011	58
X280/09	KO	w	4	8	01.09.2009	30.10.2009	59
X013/10	KO	m	4	10	10.11.2009	26.01.2010	77
X014/10	WT	m	4	8	25.11.2009	26.01.2010	62
X015/10	KO	w	4	10	16.11.2009	26.01.2010	71
X016/10	WT	w	4	10	10.11.2009	26.01.2010	77
X017/10	WT	m	4	10	16.11.2009	26.01.2010	71
X060/10	WT	w	4	10	02.12.2009	13.02.2010	73
X110/10	WT	w	4	9	21.01.2010	30.03.2010	68
X111/10	KO	m	4	9	21.01.2010	30.03.2010	68
X116/10	KO	m	4	10	08.02.2010	20.04.2010	71
X117/10	WT	m	6	10	08.02.2010	22.04.2010	73
X119/10	WT	w	6	10	08.02.2010	22.04.2010	73
X157/10	KO	m	6	9	28.03.2010	07.06.2010	71
X158/10	KO	m	6	9	31.03.2010	07.06.2010	68
X159/10	WT	w	6	9	31.03.2010	07.06.2010	68
X161/10	WT	w	6	9	31.03.2010	07.06.2010	68
X162/10	KO	w	6	9	28.03.2010	07.06.2010	71
X163/10	WT	w	6	9	31.03.2010	07.06.2010	68
X191/10	KO	m	6	8	26.04.2010	28.06.2010	63
X219/10	KO	w	6	8	12.06.2010	16.08.2010	65
X168/10	WT	m	10	9	28.03.2010	11.06.2010	75
X169/10	WT	w	10	9	28.03.2010	11.06.2010	75
X193/10	WT	m	10	8	26.04.2010	02.07.2010	67
X198/10	WT	w	10	10	27.04.2010	16.07.2010	80
X216/10	KO	m	10	9	30.05.2010	09.08.2010	71
X217/10	KO	w	10	9	30.05.2010	09.08.2010	71
X218/10	WT	w	10	9	29.05.2010	09.08.2010	72
X224/10	KO	m	10	8	12.06.2010	20.08.2010	69
X225/10	KO	m	10	8	12.06.2010	20.08.2010	69
X130/11	KO	m	10	9	30.05.2011	08.08.2011	70
X069/11	WT	m	21	11	15.12.2010	21.03.2011	96
X070/11	WT	m	21	8	02.01.2011	21.03.2011	78
X103/11	KO	m	21	8	22.03.2011	09.06.2011	79
X104/11	KO	m	21	8	22.03.2011	09.06.2011	79
X105/11	KO	m	21	8	22.03.2011	09.06.2011	79
X106/11	WT	w	21	9	18.03.2011	09.06.2011	83
X107/11	KO	w	21	8	22.03.2011	09.06.2011	79

X110/11	WT	w	21	10	18.03.2011	14.06.2011	88
X111/11	WT	w	21	10	18.03.2011	14.06.2011	88
X116/11	KO	w	21	8	27.04.2011	13.07.2011	77
X247/10	WT	w	42	9	20.07.2010	05.11.2010	108
X249/10	WT	w	42	9	20.07.2010	05.11.2010	108
X251/10	WT	m	42	8	22.08.2010	30.11.2010	100
X003/11	KO	m	42	9	20.09.2010	06.01.2011	108
X004/11	KO	m	42	8	27.09.2010	06.01.2011	101
X006/11	KO	w	42	7	28.10.2010	26.01.2011	90
X068/11	WT	m	42	10	28.10.2010	18.02.2011	113
X082/11	WT	m	42	11	15.12.2010	11.04.2011	117
X083/11	KO	m	42	9	27.12.2010	11.04.2011	105
X112/11	KO	w	42	9	18.03.2011	30.06.2011	104

Tab. 2 Noxa-Tiere

Tier	Genotyp	Geschlecht	Dauer (d)	Alter bei Start (w)	Geburtsdatum	Sterbedatum	Alter bei Tod (d)
X094/10	WT	w	0	8	06.01.2010	05.03.2010	58
X095/10	WT	w	0	8	06.01.2010	05.03.2010	58
X097/10	WT	m	0	8	06.01.2010	05.03.2010	58
X234/10	KO	w	0	9	26.07.2010	27.09.2010	63
X235/10	KO	w	0	10	21.07.2010	27.09.2010	68
X236/10	KO	w	0	10	21.07.2010	27.09.2010	68
X237/10	KO	w	0	9	26.07.2010	27.09.2010	63
X238/10	KO	m	0	8	30.07.2010	27.09.2010	59
X101/11	WT	m	0	10	22.03.2011	03.06.2011	73
X117/11	WT	w	0	8	22.05.2011	20.07.2011	59
X008/10	KO	m	4	9	23.11.2009	26.01.2010	64
X009/10	KO	m	4	9	23.11.2009	26.01.2010	64
X010/10	WT	m	4	9	23.11.2009	26.01.2010	64
X011/10	KO	m	4	9	23.11.2009	26.01.2010	64
X012/10	KO	m	4	9	23.11.2009	26.01.2010	64
X059/10	WT	w	4	9	07.12.2009	13.02.2010	68
X061/10	WT	w	4	9	07.12.2009	13.02.2010	68
X096/10	WT	w	4	8	06.01.2010	05.03.2010	58
X098/10	KO	w	4	8	06.01.2010	05.03.2010	58
X239/10	WT	w	4	8	11.08.2010	11.10.2010	61
X277/09	KO	m	6	9	20.08.2009	28.10.2009	69
X278/09	KO	m	6	9	20.08.2009	28.10.2009	69
X279/09	KO	m	6	9	20.08.2009	28.10.2009	69
X332/09	KO	m	6	9	05.10.2009	14.12.2009	70
X333/09	WT	w	6	9	05.10.2009	14.12.2009	70
X334/09	KO	m	6	9	05.10.2009	14.12.2009	70
X118/10	WT	m	6	11	01.02.2010	22.04.2010	80
X190/10	WT	w	6	8	25.04.2010	28.06.2010	64
X195/10	WT	m	6	8	01.05.2010	05.07.2010	65
X196/10	WT	m	6	9	28.04.2010	05.07.2010	68
X171/10	KO	m	10	8	03.04.2010	11.06.2010	69
X194/10	KO	w	10	8	25.04.2010	02.07.2010	68

X201/10	KO	m	10	9	12.05.2010	23.07.2010	72
X202/10	WT	m	10	9	12.05.2010	23.07.2010	72
X204/10	KO	m	10	9	12.05.2010	23.07.2010	72
X226/10	WT	m	10	9	11.06.2010	20.08.2010	70
X074/11	KO	w	10	10	16.01.2011	04.04.2011	78
X075/11	WT	w	10	10	16.01.2011	04.04.2011	78
X076/11	WT	w	10	10	16.01.2011	04.04.2011	78
X102/11	WT	w	10	10	18.03.2011	03.06.2011	77
X001/11	KO	m	21	9	11.10.2010	05.01.2011	86
X057/11	KO	m	21	11	25.10.2010	28.01.2011	95
X058/11	KO	w	21	8	14.11.2010	28.01.2011	75
X059/11	KO	w	21	11	25.10.2010	28.01.2011	95
X060/11	WT	m	21	8	12.11.2010	28.01.2011	77
X077/11	WT	m	21	9	09.01.2011	05.04.2011	86
X078/11	WT	m	21	9	09.01.2011	05.04.2011	86
X079/11	WT	w	21	14	10.12.2010	05.04.2011	116
X080/11	KO	w	21	14	10.12.2010	05.04.2011	116
X081/11	WT	w	21	14	10.12.2010	05.04.2011	116
X244/10	WT	m	42	8	30.07.2010	05.11.2010	98
X245/10	KO	m	42	8	30.07.2010	05.11.2010	98
X246/10	KO	m	42	8	30.07.2010	05.11.2010	98
X248/10	KO	w	42	8	30.07.2010	05.11.2010	98
X250/10	KO	m	42	8	11.08.2010	17.11.2010	98
X002/11	KO	m	42	8	29.09.2010	06.01.2011	99
X005/11	WT	m	42	9	11.10.2010	26.01.2011	107
X008/11	WT	w	42	9	11.10.2010	26.01.2011	107
X066/11	WT	w	42	11	25.10.2010	18.02.2011	116
X067/11	WT	m	42	11	25.10.2010	18.02.2011	116

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel

Lürbke A, Preisner A, Cui Q, Hagemeyer K, Brück W, Antel J, Kuhlmann T. Absence of nuclear β -catenin and limited TCF7L2 expression in MS lesions. *in Vorbereitung*

Hagemeyer K, **Lürbke A**, Hucke S, Albrecht S, Preisner A, Klassen E, Hoffmann E, Brück W, Klotz L, Kuhlmann T. Puma, but not Noxa is essential for oligodendroglial cell death. *eingereicht*

Hesse A R, Hagemeyer K, **Lürbke A**, Held J, Friedman H, Peterson A, Brück W, Kuhlmann T (2012). XIAP protects oligodendrocytes against cell death in vitro but has no functional role in toxic demyelination. *Glia* 60(2): 271 – 280

Kurzvortrag

Lürbke, A, Antel J, Brück W, Kuhlmann T. TCF7L2 expression is observed in early but not in chronic MS lesions. 20th ARSEP Foundation Meeting 2011

Poster

Hagemeyer K, **Lürbke A**, Hoffmann E, Kuhlmann T. The pro-apoptotic bcl-2 family member puma but not noxa is essential for cuprizone-induced oligodendroglial cell death. 20th ARSEP Foundation Meeting 2011

Lürbke A, Klassen E, Hesse A R, Salinas-Riester G, Kuhlmann T. Puma plays an important role in cuprizone induced oligodendroglial cell death in mice. Myelin Netzwerk eV Konferenz 2011

Lürbke A., Hesse A R, Salinas-Riester G, Kuhlmann T. The functional role of PU-MA and NOXA in oligodendroglial cell death. 54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft Neuropathologie und Neuroanatomie 2009

Danksagung

Hier möchte ich den Menschen danken die maßgeblich an meiner Dissertation und meiner akademischen Ausbildung beteiligt waren:

An erster Stelle meiner Doktormutter **Prof. Dr. Tanja Kuhlmann**. Sie hat über die wissenschaftliche Betreuung hinaus stets mein Fortkommen unterstützt, den richtigen Ton und vor allem Nerv getroffen und dadurch nicht nur zum Gelingen dieser Forschungsarbeit beigetragen.

Frau **Prof. Dr. Eva Liebau** für die Übernahme des Zweitreferats und die unterhaltsame Zeit, die ich als Betreuer des Praktikums in ihrem Institut hatte.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen **Amke, Elke, Karin, Steffi, Anna** und **Claudia** dafür, dass sie die Arbeit in Labor und Büro nie haben langweilig werden lassen und für unterhaltsame Stunden, auch abseits von Labor und Schreibtisch. Die Arbeitsgruppen-Treffen, Geburtstagsfeiern, etc. waren zum Teil legen... Amke darüber hinaus für blindes Verständnis.

Meinen Eltern, **Erika** und **Burckhard Lürbke**, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und nie an deren Sinn gezweifelt haben. Die aber auch durch das frühe Fördern meiner Neugier sowieso selber schuld sind!

Meiner abartig scharfsinnigen Schwester **Verena Lürbke**, die mit mir einen großen Teil der akademischen Ausbildung gemeinsam gegangen ist und so auch den Weg zu dieser Dissertation mitgeebnet hat.

Meiner Freundin **Dr. Kathrin Halama** für gemeinsame härteste Entscheidungen, ...und viel Quatsch!

Ein Dank gilt auch den Lektoren **Dr. Kathrin Halama** und **Martin Brungert**.

Andrea Wagner für gesunden Menschenverstand.

Dem Dinner-Club: **Dr. Kathrin Weber, Dr. Cordula Kempkes, Dr. Julia Farr** und **Dr. Arne Herring**, die frecherweise vor mir angefangen haben.

Meinen Freunden **Johannes, Litti, Amke, David, Ingo und Mike** für Diskurse, Zustimmung, Wildbret, Lebensweisheiten und vor allem lange Nächte.

Lebenslauf