
Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus-

Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Vitalität,
Proliferation und Differenzierung von primären
Oligodendrozytenprogenitorzellen *in vitro*

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Lilienbeck, Johanna

aus Wuppertal

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Kuhlmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schilling

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Neuropathologie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus-

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Kuhlmann

Koreferent: Prof. Dr. med. Matthias Schilling

ZUSAMMENFASSUNG

Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Vitalität,
Proliferation und Differenzierung von primären

Oligodendrozytenprogenitorzellen *in vitro*

Lilienbeck, Johanna

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg spielt in der Zelllinienentwicklung und Differenzierung verschiedener Zellarten eine große Rolle. Unter anderem wird vermutet, dass er Einfluss auf die Reifung von Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) hat. Einer Theorie zufolge behindert ein aberranter Signalweg im Verlauf der Multiplen Sklerose die Remyelinisierung demyelinisierter Axone; durch eine Differenzierungshemmung der OPCs.

Es konnte gezeigt werden, dass Acetylsalicylsäure (ASS) den Wnt/ β -Catenin-Signalweg *in vitro* hemmen kann. Unter einer Hemmung des Signalwegs wurde eine Differenzierungssteigerung von OPCs beobachtet. Folglich stellt sich die Frage, ob Aspirin als mögliches Therapeutikum eine Steigerung der Differenzierung von OPCs bewirken kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre Maus-OPCs (tierexperimentelle Arbeit genehmigt am 30.12.2010 unter dem Aktenzeichen 8.87-51.05.20.10.262) mit verschiedenen Konzentrationen von ASS behandelt. Die Reifung wurde auf Gen-, Protein- und morphologischer Ebene dargestellt und beurteilt. Unter 5 mM ASS konnten nach 48 Stunden signifikant mehr unreife Oligodendrozyten in den Durchsichtbildern und in der *Mag-*, *Mbp-* und *Plp-*Genexpressionsanalyse beobachtet werden. Dies konnte auch auf Myelinproteinebene (Immunzytochemische Färbung) nachvollzogen werden. Die erwartete Differenzierungssteigerung unter einer ASS-Behandlung wurde nicht beobachtet.

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2016

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Vitalität, Proliferation und Differenzierung von primären Oligodendrozytenprogenitorzellen *in vitro*

im Institut für Neuropathologie – Universitätsklinikum Münster
unter der Anleitung von Univ.- Prof. Dr. Tanja Kuhlmann

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der in der Literatur angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den

.....
Johanna Lilienbeck

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	7
1.1 Multiple Sklerose	7
1.1.1 Epidemiologie	7
1.1.2 Ätiologie.....	8
1.1.3 Pathologie	8
1.1.4 Symptome	9
1.1.5 Verlauf	10
1.1.6 Therapie	11
1.2 Oligodendrozyten und Re-/ Myelinisierung	11
1.3 Myelinproteine	13
1.4 Wnt/β-Catenin-Signalweg	14
1.5 Acetylsalicylsäure	16
1.6 Fragestellung / Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Versuchstiere	19
2.1.2 Geräte.....	19
2.1.3 Grundlösungen, Zusätze und Chemikalien.....	21
2.1.5 Gebrauchsfertige Lösungen / Kits	25
2.1.6 Primer	26
2.1.7 Antikörper.....	26
2.1.8 Medikament.....	27
2.1.9 Software	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Puffer- und Lösungszusammensetzungen	28
2.2.2 Ansatz der Medikamentenlösung.....	34
2.2.3 Beschichtung der Kulturflaschen	35
2.2.4 Isolierung primärer Zellen aus P6-P9 C57BL/6-Mäusen	35
2.2.6 Passagieren der Zellen.....	37
2.2.7 Zellzahlbestimmung	38
2.2.8 MTT-Test.....	39
2.2.9 BrdU-Test.....	39
2.2.10 Differenzierungszeitachse	40
2.2.11 Myelingenexpressionsanalyse.....	41
2.2.12 Immunocytochemie (ICC).....	45
2.2.13 Statistische Auswertung	46
3. Ergebnisse	49
3.1 Etablierung der Laborbedingungen	49

3.2 Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die metabolische Aktivität primärer OPCs	50
3.3 Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die Proliferation primärer OPCs	51
3.4 Differenzierung der primären OPCs unter Acetylsalicylsäure	53
3.4.1 Differenzierungszeitachse	53
3.4.2 Analyse der Myelingenexpression anhand einer Quantifizierung des mRNA-Levels	55
3.4.3 Darstellung der Differenzierung mittels immunzytochemischer Markierung	57
4. Diskussion	59
4.1 Theoretischer Hintergrund	59
4.1.1 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg als therapeutisch relevanter Signalweg	59
4.1.2 Die Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der oligodendroglialen Differenzierung und der Multiplen Sklerose	61
4.1.3 Durch ASS beeinflusste Signalwege und ihre Einsatzmöglichkeiten	63
4.1.4 Einfluss von ASS und anderen NSAR auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg	65
4.1.5 ASS-Dosierung in Versuch und Praxis	67
4.2 Diskussion der Ergebnisse	68
4.2.1 Einfluss von ASS auf die metabolische Aktivität und Proliferation von OPCs	68
4.2.2 Einfluss von ASS auf die Differenzierung von OPCs	69
4.3 Kritikpunkte an der vorliegenden Arbeit	72
4.3.1 Konzeptionelle Kritikpunkte und Ausblick	72
4.3.2 Methodische Kritikpunkte und Ausblick	73
Literaturverzeichnis	77
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	95
Lebenslauf	97
Danksagung	98
Anhang	I

Abkürzungsverzeichnis

-	minus / bis
%	Prozent
α	Alpha
β	Beta
δ	Delta
γ	Gamma
=	gleich / ergibt
κ	Kappa
+	plus / positiv
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$
/	pro / oder
<	kleiner als
>	größer als
÷	geteilt durch
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
1°	primär
2°	sekundär
2-ME	2-Mercaptoethanol
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ANOVA	<i>engl.: analysis of variance</i> , Varianzanalyse univariant
APC	Adenomatöse Polipolis Coli
ASS	Acetylsalicylsäure
bidest.	bidestilliert

BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6	C57-black six, Labormausstamm
ca.	circa
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i> , internationales System für die Bezeichnung von Differenzierungsantigenen
cDNA	<i>engl.: complementary desoxyribonucleic acid</i> komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CNTF	<i>engl.: ciliary neurotrophic factor</i> , ziliärer neurotrophischer Faktor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX1 / COX2	Cyclooxygenase 1 / Cyclooxygenase 2
Ct-Wert	<i>engl.: cycle treshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
d	Tage
DAPI	Diamino-2-Phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.: desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
DNase	<i>engl.: desoxyribonuclease</i> , Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
Dsh	Dishevelled
E	embryonales Alter in Tagen
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBSS	<i>engl.: Earle´s Balanced Salt Solution</i>
EGTA	Ethylenglykol-Tetraessigsäure
ELISA	<i>engl.: enzyme linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunabsorptionstest

<i>engl.</i>	englisch
et. al.	<i>lat.: et alii</i> , und andere
EtOH	Ethanol
f.	für
FAPC	Familiäre Adenomatöse Poliposis Coli
FCS	<i>engl.: fetal calf serum</i> , fetales Kalbserum
FSS	<i>engl.: Fatigue Severity Scale</i>
g	Gramm
GF	<i>engl.: growth factor</i> , Wachstumsfaktor/-en
GSK	Glykogensynthase-Kinase
h	Stunde/-n
H ₂ O	Wasser
H ₂ O steril	steriles Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Chlorwasserstoff / Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
ICC	<i>engl.: immunocytochemistry</i> , Immunzytochemie
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPS	induzierte pluripotente Stammzelle
IVIG	intravenöse Immunglobulingabe
jew.	jeweils
k	Kilo
KG	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
l	Liter
<i>lat.</i>	Latein
LD50	letale Dosis bei 50% der Versuchstiere
LRP	<i>engl.: low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
m	Milli / Meter
M	Molar (mol / Liter)

MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAP	<i>engl.: mitogen-activated protein kinase</i> , Kinase des mitogen aktivierten Proteins
MBP	Myelin-basisches Protein
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min.	Minuten
mind.	Mindestens
MOBP	Myelin-assoziiertes Oligodendrozyten-basisches Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mol	Einheit der Stoffmenge
MP	Mikrotiterplatte
mRNA	<i>engl.: messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MTT	Dimethylthiazol-Diphenyltetrazolium-Bromid
n	Nano / Anzahl der Versuchswiederholungen
Na ₂ SeO ₃	Natriumselenit
NAC	N-Acetylcystein
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxyd
NO	Stickstoffmonoxyd
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NT3	Neurotrophin 3
OPCs	<i>engl.: oligodendrocyte progenitor cells</i> , Oligodendrozytenvorläuferzellen
OSP	Oligodendrozyten-spezifisches Protein
P	postnatales Alter in Tagen
p	Signifikanzwert in der Statistik
PBS	<i>engl.: Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>engl.: polymerase chain reaktion</i> , Polymerase-Kettenreaktion

PDGF-AA	<i>engl.: platelet derived growth factor AA</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	peripheres Nervensystem
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
prim.	primär
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
q-RT-PCR	<i>engl.: quantitative real time PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
RNA	<i>engl.: ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAse	<i>engl.: ribonuclease</i> , Ribonuklease
<i>Rplp0</i>	<i>engl.: ribosomal protein, large, P0</i> , großes ribosomales Protein 0
rpm	<i>engl.: rounds per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	<i>engl. : reverse transcription</i> , reverse Transkription
S.	Seite
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sek.	sekundär
Sek.	Sekunde/ -n
SEM	<i>engl.: standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SFRP	<i>engl.: secreted frizzled-related protein</i> , sezerniertes Frizzled-bezogenes Protein
sog.	sogenannt/-en

Sox	<i>engl.: sex determining region</i> Y-box, geschlechterterminierende Region Y-Box
β	Beta
TCF	<i>engl.: transcription factor</i> , Transkriptionsfaktor
TMB	Tetramethylbenzidin
TMEV	Theilers muriner Enzephalomyelitisvirus
U	<i>engl.: Unit</i> , Einheit
u.a.	unter anderem
USA	<i>engl. : United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
WBC - Signalweg	Wnt/β-Catenin-Signalweg
x	mal
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Der erste dokumentierte Fall von Multipler Sklerose (MS) war wohl der des 1794 geborenen Augustus d´Esté, der in seinem Tagebuch die Symptome seiner Krankheit niederschrieb (96). Systematisch wurde die MS jedoch erstmals von Dr. Jean Martin Charcot im Jahr 1868 beschrieben (187). Es handelt sich nach heutigem Stand um eine Autoimmunerkrankung, die mit demyelinisierenden Läsionen im gesamten zentralen Nervensystem (ZNS) einhergeht und zu den chronisch-entzündlichen Erkrankungen zählt. Hierbei werden die Oligodendrozyten, die myelinbildenden Zellen des ZNS, angegriffen und zerstört. Diese Zerstörung der Myelinscheiden und die darauf folgende disseminierte, plaqueartige Vernarbung ist mit einer Prävalenz von ca. 0,15% (Deutschland) (76) die häufigste chronische ZNS-Erkrankung im jungen Erwachsenenalter.

1.1.1 Epidemiologie

MS wird meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr erstdiagnostiziert; das Geschlechterverhältnis von betroffenen Frauen zu Männern liegt bei ca. 3 : 1, pro Lebensdekade nimmt der Anteil der Frauen um ca. 50% zu (134). Es besteht ein regionaler Unterschied in der Inzidenzrate: in den USA wurde ein Nord-Süd-Gradient beobachtet, wobei die Erkrankungswahrscheinlichkeit in nördlichen Staaten höher als in den südlichen war (93). Die Erkrankungswahrscheinlichkeit wird außerdem in Europa, Südastralien, Neuseeland und Nordamerika als besonders häufig, in Südamerika, Afrika und Ostasien dagegen als selten angegeben (123). Es sollte jedoch bei der Interpretation beachtet werden, dass beispielsweise ungenaue oder fehlende Diagnoseerhebungen oder eine verminderte Lebenserwartung in einigen Ländern eine Verzerrung der Daten mit sich bringen können (85). Interessant ist, dass erwachsene Migranten die Erkrankungswahrscheinlichkeit ihres Ursprungslandes beibehalten. Kinder jedoch, die vor dem 15. Lebensjahr umsiedeln, nehmen die Erkrankungswahrscheinlichkeit des Ziellandes an. Auch die ethnische Gruppenzugehörigkeit spielt eine Rolle: sowohl einige afrikanische Stämme als auch die neuseeländischen Maori sind äußerst selten betroffen, wohingegen bei

Nordeuropäern oder aus Nordeuropa stammenden Menschen die MS besonders häufig auftritt (38,123,173).

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der MS gilt als nicht abschließend geklärt. Aufgrund epidemiologischer Daten werden jedoch einige Ansätze diskutiert, bei denen die Fehlleitung des Immunsystems eine Rolle spielt. Zwillings- und Geschwisterstudien deuten auf eine genetische Disposition hin. Ist ein Zwilling erkrankt, steigt das Erkrankungsrisiko für den anderen Zwilling deutlich an (160,198).

Migrationsstudien (s.o.) geben Hinweise auf Umwelteinflüsse oder Infektionen im Kindesalter, die die Entstehung der MS begünstigen können. Zu den möglichen Erregern zählen z.B. *Clamydia pneumoniae* (183), Humanes Herpes-Virus 6 (5), Epstein-Barr-Virus (20) oder eine Kombination verschiedener Erreger (66). Verschiedene Arbeitsgruppen führten Genscreens durch, die zu dem Ergebnis führten, dass eine Assoziation mit unterschiedlichen Genen anzunehmen ist (83), so z.B. das *International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*, welches eine Assoziation mit *HLA-DRB1* als Risikoallel fand (80).

1.1.3 Pathologie

Die Läsionen können im gesamten ZNS auftreten. Prädilektionsstellen befinden sich jedoch periventrikulär in der weißen Substanz, besonders im Frontallappen, im *Nervus Opticus* und im Rückenmark in der zervikalen *Medulla Spinalis* (75). Die Pathogenese der MS ist genau wie ihre Ätiologie noch nicht vollständig geklärt. Ob die Schädigung der Oligodendrozyten direkt oder über Autoimmunprozesse erfolgt, bleibt bisher offen (146).

Histopathologisch finden sich für beide Theorien Hinweise. Es zeigt sich ein entzündliches Infiltrat aus CD4-positiven T-Zellen und Makrophagen, eine geringfügige bis deutliche Schädigung der Axone und eine reaktive Gliose (2,87,191). Lassmann und Lucchinetti teilen die histologischen Befunde nach dem Vorkommen von T-Zellen, Makrophagen, Immunglobulinen, Komplementfaktoren, MAG-Verlust, Apoptose der Oligodendrozyten und Remyelinisierung in vier Gruppen ein:

Gruppe I	Makrophagenvermittelte Demyelinisierung
Gruppe II	Antikörpervermittelte Demyelinisierung
Gruppe III	distale Oligodendrogliopathie und Apoptose
Gruppe IV	primäre Oligodendrozytendegeneration

Tab. 1.1: Pathogeneseformen der Multiplen Sklerose (modifiziert nach Lassmann und Lucchinetti (99))

Gruppe II scheint am häufigsten vertreten zu sein. Typisch für Läsionen dieser Gruppe ist ein Makrophagen- und T-Zell-reiches perivenöses Infiltrat, Ablagerungen von v.a. Immunglobulin G und aktiviertem Komplement (C9neo). Besonders der deutlich erhöhte Immunglobulingehalt lässt hier an eine autoimmunassoziierte Pathogenese denken, bei der aktivierte CD4-positive T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden, im ZNS Phagozyten rekrutieren und über eine inflammatorische Reaktion Immunglobuline gebildet werden (108).

Im Gegensatz wurde bei eine Studie 2004 bei der histopathologischen Untersuchung von Hirngewebe verstorbener Patienten teilweise kein entzündliches Infiltrat nachgewiesen - bei deutlichem oligodendroglialen Zelltod (8).

Die vorherrschende aktuelle Meinung sieht die Pathogenese der MS allerdings als interindividuell sehr variabel und postuliert verschiedene mögliche Entstehungswege (117).

1.1.4 Symptome

Zu den Symptomen, die meist in Schüben auftreten, gehört u.a. die von Charcot beschriebene Trias bestehend aus Nystagmus, Ataxie und Dysarthrie (91,145). Aufgrund der zeitlich und örtlich disseminierten Demyelinisierung, die alle Teile des ZNS betreffen kann, werden jedoch auch verschiedenste andere neurologische Symptome beobachtet, die unabhängig voneinander und parallel auftreten können. Die retrobulbäre Optikusneuritis und Parästhesien gelten als typische Initialsymptome bei jüngeren Patienten (144). Das Risiko, nach einer isolierten Optikusneuritis eine MS zu entwickeln, liegt bei ca. 50% (178). Das Fatigue-Syndrom als weiteres Symptom der MS ist psychisch sehr belastend, da es einem ständigen Erschöpfungsgefühl entspricht (62); der Schweregrad wird durch die *Fatigue Severity*

Skale (FSS) mittels Punktesystem ermittelt (89). Die Symptome können sich wieder komplett zurückbilden oder bestehen bleiben, dies hängt außer von der Schubdauer auch von der Art der klinischen Symptomatik (Optikusneuritis und Parästhesien bilden sich häufig besser zurück), dem Krankheitstyp und der Erkrankungsdauer ab (15).

1.1.5 Verlauf

Als Schub werden neu auftretende, mindestens 24 Stunden bestehende Symptome bezeichnet, die nicht aufgrund einer Infektion oder Änderung der Körpertemperatur (Uhthoff-Phänomen) bestehen (184). Der einzelne Schub dauert typischerweise 2 - 3 Wochen, zwei separate Schübe lassen sich diagnostizieren, wenn zwischen ihnen mindestens 30 Tage liegen (114,144).

Es sind 4 Verlaufstypen nach Lublin und Reingold bekannt: der rezidivierend remittierende Typ, der sekundär progrediente Typ, der primär progrediente Typ und der primär progrediente Typ mit aufgesetzten Schüben. Die verschiedenen Typen gehen jedoch häufig ineinander über. Zu Beginn zeigen 90% der Patienten einen rezidivierend remittierenden Verlauf, der jedoch nach 10 - 15 Jahren zu 30 - 40% in einen sekundär progredienten Typ übergeht. Der primär progrediente Verlauf ist mit 10% relativ selten (107).

Der Wiederaufbau der Nervenscheiden nach einer Schädigung, die Remyelinisierung, geht von Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs / engl.: *oligodendrocyte progenitor cells*) aus. Die Remyelinisierungstendenz scheint jedoch mit zunehmender Krankheitsdauer der MS abzunehmen. Ursächlich wird hier u.a. eine Störung der Differenzierung von OPCs zu reifen Oligodendrozyten vermutet (22).

Der Grad der Behinderung infolge von MS wird nach Kurtzke mithilfe einer Punkteskala bestimmt (92), hier entspricht Grad 0 einer „unauffälligen neurologischen Untersuchung“ und Grad 10 dem „Tod infolge MS“. Die Verläufe sind interindividuell zwar sehr unterschiedlich, unabhängig vom Verlaufstyp liegt das Intervall zwischen Behinderungsgrad 4 (500 m Gehstrecke, schwere Behinderung in einem funktionellen System) und Grad 6 (Gehhilfe nötig um 100 m zu gehen) jedoch ziemlich genau bei 5,5 Jahren (33).

1.1.6 Therapie

Bisherige Therapieansätze sind immunmodulatorisch, immunsuppressiv oder symptomatisch. Eine kausale Therapie konnte noch nicht entwickelt werden. Die Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft spricht jedoch eine Therapieempfehlung aus: für die Basistherapie wird Interferon- β oder Glitarameracetat bzw. Azathioprin oder eine intravenöse Immunglobulingabe (IVIG) empfohlen, im akuten Schub eine Cortisonstoßtherapie, die gegebenenfalls durch eine Plasmapherese ergänzt werden kann. Die Eskalationstherapie beinhaltet immunsuppressive Medikamente wie Natalizumab oder Mitoxantron (41). Außerdem werden supportive Maßnahmen angeboten, die die Symptomausprägung positiv beeinflussen sollen.

1.2 Oligodendrozyten und Re-/ Myelinisierung

Die myelinscheidenbildenden Zellen des ZNS sind die Oligodendrozyten (18). Sie gehen aus Oligodendrozytenvorläuferzellen hervor. Diese entspringen wiederum neuralen Stammzellen, welche aus dem ventralen periventrikulären Teil des Neuralrohrs entstehen und in die spätere weiße Substanz einwandern (196,211). Anhand der Expression spezifischer Antigene können die Vorläuferzellen verschiedenen Stadien der Entwicklung zugeordnet werden. Die Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Vorläuferzellen anhand von Antigenen ist genauer und daher besser möglich als die Zuordnung anhand der Morphologie (151).

Schema der Entwicklungsstadien von OPCs zu myelinisierenden Oligodendrozyten

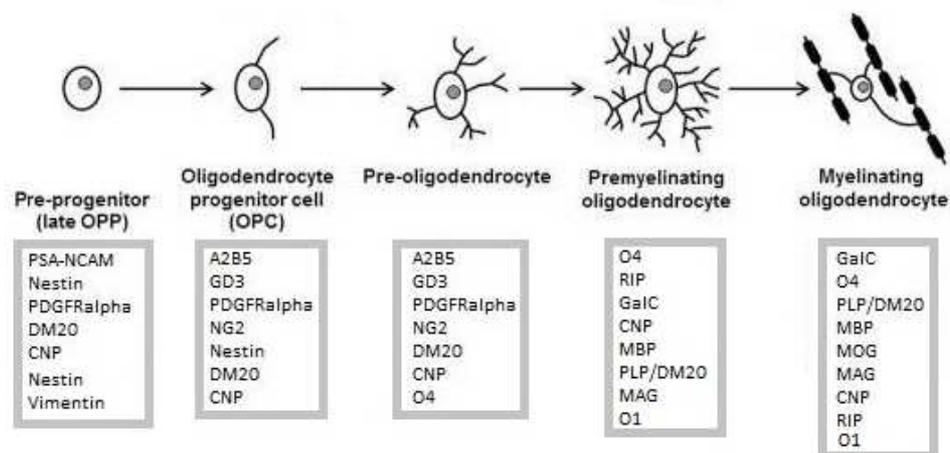


Abb. 1.1: Stadien der Oligodendrozytenentwicklung anhand von Morphologie und immunohistochemischen Markern. Modifiziert nach Schumacher et al. (166). Mit freundlicher Genehmigung von Schumacher, Hussain, Gago, Oudinet, Mattern and Ghoumari.

Oligodendrozytenvorläufer exprimieren in frühen Stadien unter anderem das A2B5-Antigen und das PDGFRalpha-Antigen. In diesen Stadien verbleiben und proliferieren sie *in vitro* nach Zugabe des Wachstumsfaktors *platelet derived growth factor* AA (PDGF-AA) (129). In späteren Stadien exprimieren die prämaternen GalC-positiven Oligodendrozyten O4 und O1 und als myelinbildende Zellen die Myelinproteine Myelin-basisches Protein (MBP), Proteolipid-Protein (PLP) und Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) (82,179).

Die Myelinscheiden, die das Axon umhüllen, sind für die schnelle Potentialweiterleitung essentiell, da diese eine saltatorische und somit erheblich schnellere Erregungsleitung ermöglichen. Außerdem unterstützen sie den axonalen Transport und haben protektive Effekte auf das Axon (50,142,171,208). Kommen Vorläuferzelle und Axon in Kontakt, beginnen die OPCs auszdifferenzieren, wobei sie Membranausläufer aus Myelin bilden, die sich um das Axon winden (171).

Ist eine Schädigung des Myelins eingetreten und fehlt komplett, spricht man von einer Demyelinisierung der Axone. Um den Funktionsverlust auszugleichen, sind Oligodendrozytenvorläuferzellen in der Lage, zur Läsion zu migrieren, dort zu

differenzieren und die Axone erneut mit Myelin zu ummanteln (61). Diese Erneuerung des Myelins, die Remyelinisierung, ist zur Aufrechterhaltung der axonalen Funktionen unbedingt nötig. Bei längerfristigem Bestehen des Myelinschadens zieht dieser einen axonalen Schaden nach sich und manifestiert sich klinisch durch Funktionsverlust der entsprechend assoziierten Areale (203).

Nach einem Schub wird in MS-Läsionen dieser zuvor beschriebene endogene Reparaturprozess beobachtet, die Remyelinisierungsbereitschaft nimmt jedoch mit zunehmender Erkrankungsdauer ab (64). Hier wird ursächlich unter anderem eine Blockierung der Differenzierung der Progenitorzellen zu reifen Oligodendrozyten vermutet (22,90), weshalb die medikamentöse Modulation der OPC-Differenzierung einen wichtigen Aspekt der aktuellen Forschung darstellt.

1.3 Myelinproteine

Das Myelin unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung von anderen Membranen insbesondere durch seinen hohen Lipidanteil (70%-80% des Trockengewichts) (131). Die Myelinproteine, die die restlichen 20-30% stellen und die Struktur des Myelins aufrecht erhalten, sind jedoch ebenso wichtig, was in Mutationsmodellen gezeigt werden konnte (29,37,116). Sie setzen sich wie folgt zusammen:

30-40% des Myelinproteinanteils des ZNS macht das Myelin-basische Protein (MBP) aus. Es ist ein Protein der *Major Dense Line* des Zytosols (132) und essentiell für die Funktion des Myelins. MBP-defiziente Mutanten im Tiermodell, die sogenannten Shiverer-Mäuse, bilden die *Major Dense Line* nicht aus und fallen klinisch durch Ataxien, Tremor und frühzeitiges Versterben auf (29,132,147).

Das Proteolipid-Protein (PLP) stellt ca. 50% der Myelinproteine des ZNS und ist ein integrales Membranprotein (100). Die PLP-defiziente Mutante Jimpy zeigt ähnliche, meist schwerere Symptome als die Shiverer-Mutante. Bei diesen Mäusen ist die *Intraperiod Line* nicht ausgebildet. PLP scheint eine entscheidende Rolle für Interaktionen der extrazellulären Membranen zu spielen und wird als Ionenkanal und Differenzierungsfaktor für Oligodendrozyten diskutiert (47,59,164).

Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) bildet nur einen Anteil von ca. 1% der ZNS-Myelinproteine und befindet sich ebenfalls in der Myelinmembran. MAG ist für die Axon-Glia-Kommunikation und somit für den Beginn der Myelinisierung, die Stabilität

der Verbindung und das Überleben des Axons bedeutsam (128,143). Im Experiment ist das Myelin der MAG-defizienten Mutante im Durchmesser weniger dick und hypophosphoryliert im Vergleich zur Kontrollgruppe (86).

Weitere Myelinproteine des ZNS sind u.a. das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das Myelin-assoziierte Oligodendrozyten-basische Protein (MOBP) (206), die 2',3'-Zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase (180) und das Oligodendrozyten-spezifische Protein (OSP) (16).

1.4 Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin Signalweg (WBC-Signalweg) ist ein Signaltransduktionsweg, der eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Interaktion in der allgemeinen Embryogenese spielt, also für Wachstum, Differenzierung, Migration und Polarität von Bedeutung ist (78,106). Dieser Signalweg beeinflusst außerdem speziell die Differenzierung der Oligodendrozyten und die Remyelinisierung, wohingegen die Proliferation und Migration der OPCs unbeeinflusst zu sein scheinen (53,56).

Im sogenannten kanonischen Signalweg bindet der Ligand Wnt an einen Rezeptor der transmembranen Frizzled-Familie und an den LRP-Corezeptor und phosphoryliert und aktiviert somit Dishevelled (DSH). Der Abbaukomplex um β -Catenin, welcher u.a. Axin und das Adenomatöse Poliposis Coli-Protein (APC) beinhaltet, wird gehemmt. β -Catenin kann akkumulieren, in den Nukleus wandern und dort an den Transkriptionsfaktor TCF7L2 binden. Folgend werden die Wnt-Zielgene transkribiert (10,101,141,207).

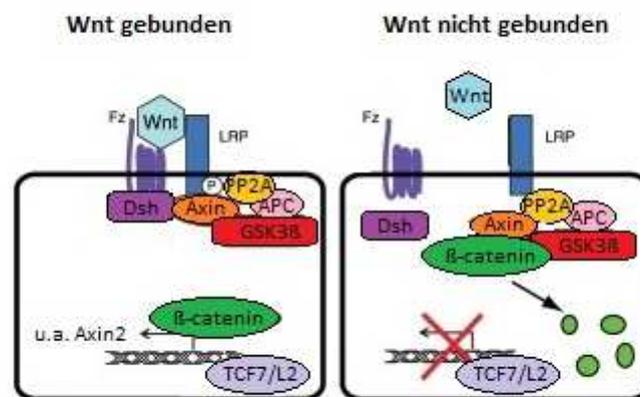


Abb. 1.2: Wnt/β-Catenin-Signalweg. Bei gebundenem Wnt ist der Abbaukomplex gehemmt und β-Catenin kann als Transkriptionsfaktor agieren. Ist Wnt nicht gebunden, kann der Abbaukomplex (u.a. Axin, APC, GSK3β) β-Catenin degradieren. Modifiziert nach Pedersen et al. (138). Mit freundlicher Genehmigung von Pedersen et al..

Der Abbaukomplex um β-Catenin ist vermehrt in den Fokus der Forschung geraten, da durch eine Dysregulation des Signalweges und eine pathologische Akkumulation von β-Catenin die Pathogenese unterschiedlicher Karzinomarten begründet zu sein scheint (106,141). Die bekannteste Prädisposition eines Karzinoms ist in diesem Zusammenhang die Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli (FAPC). Hier ist das Tumorsuppressorgen APC oder β-Catenin selbst mutiert, so dass APC seinen hemmenden Einfluss verliert (121).

Die Erforschung des Wnt/β-Catenin-Signalweges ist für das Verständnis der Pathogenese der MS ebenfalls von Interesse, da die fehlende Remyelinisierungsbereitschaft der Oligodendrozyten in chronischen MS-Läsionen u.a. auf eine Dysregulation in diesem Signalweg zurückgeführt wird. Es wird vermutet, dass die Differenzierung der OPCs durch einen übermäßig aktivierten Signalweg gehemmt sein könnte (53,54), da Analysen der Expression von Wnt-Zielgenen in MS-Läsionen eine Erhöhung zeigten. Auch der Proteingehalt von β-Catenin ist in aktiven MS-Läsionen erhöht (68,105). Es konnte außerdem *in vitro* gezeigt werden, dass durch das kleine Molekül XAV939, welches über eine Stabilisierung von Axin2 eine Hemmung des Wnt/β-Catenin-Signalweges bewirkt (55), ein positiver Einfluss auf die

Differenzierung von primären OPCs erzielt werden konnte (161). Wnt selbst, als Aktivator, oder das Fehlen von hemmenden Einflüssen (z.B. Axin2) scheinen im Gegenzug einen negativen Einfluss auf die Differenzierung der OPCs zu besitzen (55,184). *In vitro* und *in vivo* konnten Fancy et al. durch eine künstliche Aktivierung des WBCs die Expression einiger Myelogene reduzieren (53,55).

Tawk stellte mit seiner Arbeitsgruppe dazu gegensätzliche Ergebnisse vor: In der Oligodendrozytenzellkultur 158N konnte die Expression des Myelinproteins PLP unter Zugabe von Wnt1 gesteigert werden. *In vivo* zeigten Δ TCF3-Zebrafischembryos unter einer Hemmung des WBC-Signalwegs eine verminderte Myelinisierung (188).

Ein weiteres Protein des Abbaukomplexes, die Proteinphosphatase 2A (PP2A), ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschungen. Wie der Wnt/ β -Catenin Signalweg durch PP2A beeinflusst wird, ist noch nicht endgültig geklärt (150,167); die PP2A scheint mit unterschiedlichen Untereinheiten an Axin und APC zu binden und darüber Einfluss zu nehmen (79,167). Bos et al. untersuchten 2006 die Wirkung von Acetylsalicylsäure auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und zeigten eine über die PP2A vermittelte Reduktion von β -Catenin und damit eine Hemmung des Signalwegs (14).

1.5 Acetylsalicylsäure

Acetylsalicylsäure (ASS) ist der Trivialname der 2-Acetoxybenzoesäure, eines weit verbreiteten Arzneimittels aus der Klasse der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). Schon Hippokrates verwendete Weidenrinde (*Salix*) um das malariaassoziierte Fieber zu senken. Diese enthält, wie später festgestellt wurde, einen mit ASS verwandten Wirkstoff. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts konnte Salicin isoliert werden, 1853 synthetisierte Charles Gerhardt erstmalig Acetylsalicylsäure, welche von Bayer-Leverkusen 1899 unter dem Namen „Aspirin“ als Marke eingetragen wurde (42,130).

ASS wirkt über die Hemmung der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX 1, COX 2) analgetisch, antiinflammatorisch, antipyretisch und thrombozytenaggregationshemmend und über einen Umbau von Plasminogen in Fibrinolyse fibrinolytisch (127). ASS überwindet die Blut-Hirn-Schranke (7,156) und kann somit direkte Wirkungen im ZNS besitzen.

Eine häufige Nebenwirkung ist die durch die COX-Hemmung und Prostaglandinverminderung hervorgerufene Gastritis mit Ulzerationen, weshalb als Magenschutz die zusätzliche Gabe eines Protonenpumpenhemmers empfohlen wird. Bei Kindern und Jugendlichen ist der Einsatz von ASS kontraindiziert, da unter einer ASS-Therapie das Reye-Syndrom beobachtet wurde (67,127). Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus Leberfunktionsstörung und Enzephalopathie, die lebensbedrohliche Ausmaße haben kann (19,153).

Die Wirkung von ASS auf den Verlauf der Multiplen Sklerose wurde bisher in einigen Studien erforscht. In den frühen 60er Jahren konnte in einer placebokontrollierten Doppelblindstudie kein signifikanter Einfluss von ASS auf den Grad der Behinderung von MS-Patienten nachgewiesen werden (118). Dore-Duffy beschrieb 1979 eine hemmende Wirkung auf die T-Lymphozytenadhärenz (E-Rosettentest) von MS-Patienten durch ASS (45); 2005 wurde ASS als Medikament gegen die Fatigue von MS-Patienten diskutiert und ebenfalls in einer placebokontrollierten Doppelblindstudie getestet. Hierbei kam es zur subjektiven Beschwerdebesserung der Patienten unter ASS (199). 2012 zeigten Shaygannejad et al. eine signifikante Verminderung der *Fatigue Severity Scale* (FSS) von 4,6 zu 3,5 (170) durch eine ASS-Therapie. Trotz positiver Ergebnisse konnte sich ASS auch hier nicht durchsetzen.

Neuere Forschungen konzentrieren sich u.a. auf den Einfluss von ASS auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg. So hemmt ASS beispielsweise über eine gesteigerte Phosphorylierung der PP2A die Phosphatasenaktivität, β -Catenin bleibt vermehrt phosphoryliert und wird abgebaut. Letztendlich wird also die Transkription der Zielgene verhindert (14). Eine weitere Arbeit beschreibt eine Apoptoseinduktion durch ASS bei mesenchymalen Stammzellen, vermittelt über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg (195). Auch das NO-gekoppelte Nitro-ASS NCX 4016 hemmt den Wnt/ β -Catenin Signalweg, indem es die Bindung zwischen β -Catenin und TCF7L2 im Zellkern zerstört. Es konnte gezeigt werden, dass hierdurch z.B. Mammakarzinomzellen und Colonkarzinomzellen in ihrem Wachstum gehemmt werden können (125,126).

1.6 Fragestellung / Zielsetzung

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen stellt sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, ob Acetylsalicylsäure die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen beeinflusst.

Daher haben wir folgende Fragestellungen untersucht:

1. Hat ASS Einfluss auf die Vitalität und / oder die Proliferation primärer muriner OPCs?
2. Beeinflusst ASS die Differenzierung primärer muriner OPCs?

2. Material und Methoden

Alle Arbeitsschritte an den primären Zellkulturen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen an einer sterilen Werkbank mit Abzug durchgeführt. Vor Arbeitsbeginn wurde die Werkbank mit 70%igem Ethanol gereinigt. Das Arbeitslabor entsprach den Vorschriften der Sicherheitsstufe S1 zur Arbeit mit gentechnisch veränderten Organismen.

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die primären Oligodendrozytenprogenitorzellkulturen (OPCs) wurden aus C57BL/6-Mäusen sechs bis neun Tage postnatal isoliert.

Die Tiere stammten aus der Zucht der tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Universität Münster. Pflege und Beobachtung der Tiere erfolgte durch die Tierpfleger und -ärzte dieser Institution. Die Tötung der Tiere wurde gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt und dem nordrheinwestfälischen Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz in Recklinghausen angezeigt (AZ 51.05.20.10.262-Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken). Die Tiere wurden sechs bis neun Tage postnatal durch Dekapitation getötet, um anschließend die OPCs isolieren zu können.

2.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav (HICLAVE HV-85)	HMC, Tüßling, Deutschland
Brutschrank 37 °C, 5% CO ₂ (Hera Cell)	Heraeus, Wehrheim, Deutschland
Drucker (HP Laserjet P2015d)	Hewlett-Packard, Genf, Schweiz
Feinwaage (BP 211 D)	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Gefrierschrank –20 °C (Premium)	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Gefrierschrank –80 °C (Forma)	Thermo Elektron, Erlangen, Deutschland
Kühlschrank 4 °C (Profi Line)	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Binokular	Eschenbach, Nürnberg, Deutschland
Mikroskopkamera (Color View)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Multipipette (Multipette Plus)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multiwell-Spektrometer (ELISA-reader)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Nano Drop (ND 2000)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Neubauer Zählkammer 0,1 mm x 0,0025 mm ² (Improved)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR-Maschine Thermocycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Maschine StepOne Plus RT- PCR Real-Time Thermal Cycler	Applied Biosystems, Carlsbad, California
pH-Meter (766 Calimatic)	Knick, Berlin, Deutschland
Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (Multipipettus Accu- jet)	Brand, Wehrheim, Deutschland
Präparationsbesteck	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasserfilter (Milli-Q)	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Schüttler (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, New York, USA

Sterilbank (Hera Safe)	Heraeus, Wehrheim, Deutschland
Sterile Absauganlage	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Wasserbad 37 °C (GFL)	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus, Wehrheim, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1,0 R)	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland

2.1.3 Grundlösungen, Zusätze und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
B27- Supplement	Invitrogen, Carlsbad, USA
Biotin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serumalbumin, Pulver (BSA) A8806	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
CNTF (<i>ciliary neurotrophic factor</i>) 10 ug / ml	Peprtech, Hamburg, Deutschland
Desoxyribonuklease (Dnase)	CellSystems, Troisdorf, Deutschland
Diamino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose with Glutamax</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Dulbecco´s Phosphat-Buffered Saline (PBS)</i>	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
EBSS (<i>Earle´s Balanced Salt Solution</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglykol-Tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS (<i>fetal calf serum</i>) 5%ig	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glucose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O pura, Rnase frei	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	PAA, Pasching, Österreich
Insulin 5 mg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Cystein-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Fluka, Seelze, Deutschland
Mowiol 4-88	Farbwerke Hoechst, Frankfurt am Main, Deutschland
MTT (Dimethyl-Thiazolyl-Diphenyltetrazolium-Bromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

N1-Supplement	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
N-Acetyl-Cystein (NAC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumselenit, frisch (Na ₂ SeO ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Neurotrophin 3 (NT3)	Peprtech, Hamburg, Deutschland
Papain (EC-Nr: 3.4.22.2)	CellSystems, Troisdorf, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PDGF-AA (<i>platelet derived growth factor AA</i>)	Peprtech, Hamburg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Glutamin (PSG) 10,000 Einheiten Penicillin, 10,000 µg Streptomycin und 29.2 mg L-Glutamin pro ml	Invitrogen, Carlsbad, USA
Poly-L-Lysin (PLL) 0,01%ig	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Progesteron (frisch)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Putreszin (1,4-Diaminobutan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trace-Element B (Spurenelement B)	Cellgro, Manassas, Virginia, USA

Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau 0,4%ig	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin (EC-Nr.: 3.4.21.4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-Inhibitor Ovomuroid	CellSystems, Troisdorf, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Deckgläschen, eckig, rund	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Einwegskalpell	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Einwegspritze (Perfusor 50 ml)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Filter, steril (Filtropur 0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Folie, selbsthaftend, für q-RT-PCR	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glaspipetten für Pipettierhilfe (Costar: 25 ml, 10 ml, Stripette: 5 ml, 1 ml)	Corning, New York, USA
Mikrotiterplatten (Cellstar mit 24 / 48 Kavitäten)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten für q-RT-PCR	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Multipipettenspitzen (Combitips)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm Verschlussfolie	Brand, Wertheim, Deutschland

Petrischalen f. Bakterienkulturen, Durchmesser 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen f. Zellkulturen (Cellstar)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorff, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (Cellstar mit 75 cm ² Fläche)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, steril verpackt	Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Corning, New York, USA

2.1.5 Gebrauchsfertige Lösungen / Kits

BrdU-Kit (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric))

(Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)

Bestehend aus

- Fix-Denat
- Anti-BrdU-POD
- BrdU-Labeling-Reagenz
- Antibody-Dilution-Solution
- Wasch-Puffer-Konzentrat
- Substrat Tetramethylbenzidine

RNA-Kit (GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit)

(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Bestehend aus

- Sammelröhrchen (*collection tube*) 2 ml
- Bindungssäulen (*binding column*)
- Filtersäulen (*filter column*)

- Waschlösung 1(wash solution 1)
- Waschlösung 2 (wash solution 2)
- DNase 1 (D2816)
- DNase Digest-Puffer (D1556)
- Elutionslösung (elution solution)

cDNA-Kit (High Capacity cDNA-Synthesis-Kit)

(Applied Biosystems Life Technology, Carlsbad, California)

Bestehend aus

- dNTP Mix 100 mM (10x)
- RT random primer (10x)
- Multiscribe Reverse Transkriptase
- RT Puffer (10x)

2.1.6 Primer

Rplp0 (F: 5´ CGACCTGGAAGTCCAACACTAC 3´, R: 5´ATCTGCTGCATCTGCTTG 3´)

Mag (F: 5´ACCGCCTTCAACCTGTCTGT 3´, R: 5´CTCGTTCACAGTCACGTTGC 3´)

Plp (F: 5´CAAGACCTCTGCCAGTATAG 3´, R: 5´AGATCAGAACTTGGTGCCTC 3´)

2.1.7 Antikörper

Isolation der OPCs	Hersteller
<i>rat-anti-mouse CD140a</i> (Ratte-anti-Maus CD140a)	Research Diagnostic, Concord, Massachusetts, USA
<i>goat-anti-rat IgG</i> (Ziege-anti-Ratte IgG (H+L))	Dianova, Hamburg, Deutschland
Griffonia Lektin 1 2,5 mg/ml (Bandeiraea Simplicifolia Lectin, BSL1)	Vector Labs, Burlingame, California,USA

Immunzytochemische Markierung	Hersteller
1° Ak: <i>anti-MBP rat</i> 1:200 (MBP Ratte)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
2° Ak: <i>Cy 3 goat-anti- rat</i> (Ziege gegen Ratte)	Dianova, Hamburg, Deutschland
1° Ak: <i>anti-CD140 rabbit, ssc-338</i> 1:300 (PDGFR α Kanninchen)	Santa Cruz, Dallas, USA
2° Ak: <i>Alexa Fluor 433 goat-anti- rabbit</i> (Ziege gegen Kanninchen)	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.8 Medikament

Acetylsalicylsäure

(Aspirin A-5376/ ASS)

(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Form: Kristallines Pulver

Konzentration: 180,16 mg/mmol

2.1.9 Software

Software	Hersteller
Ascent Software 2.6	ThermoLabsystems, Altrincham, England
Cell-F 3.2	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software, San Diego, USA
Step One Software	Applied Biosystems, Carlsbad, California

2.2 Methoden

2.2.1 Puffer- und Lösungszusammensetzungen

Kulturmedium Grundlösungen

Sato-Stock

Bestehend aus

- 20 ml DMEM
- 200 mg Apo-transferrin
- 200 mg BSA (Sigma A-4161)
- 5 µl Progesteron (2,5 mg Progesteron + 100 µl EtOH)
- 32 mg Putreszin
- 200 µl Natriumselenit (4,0 mg Natriumselenit + 100 µl 0,1 n NaOH + 10ml DMEM)

NAC-Lösung

Bestehend aus

- 250 mg N-Acetyl-Cystein (NAC)
- 41,65 ml H₂O steril

Insulin-Lösung

Bestehend aus

- 10 ml dH₂O
- 45 µl HCl (1M)
- 50 mg Insulin

Biotin-Lösung

Von der Mischung

- 4,5 mg Biotin
- 4,5 ml DMEM

wurden 10 µl abgenommen und in 1 ml DMEM gegeben.

Forskolin-Lösung

Bestehend aus

- 10 ml Forskolin
- 487,5 µl DMSO steril

NT3-Lösung

Bestehend aus

- 10 µg NT3
- 2 ml PBS steril

PDGF-AA-Lösung

Bestehend aus

- 10 µg PDGF-AA
- 1 ml dH₂O

CNTF-Lösung

Bestehend aus

- 20 µg CNTF
- 2 ml 0,2%iges BSA (in PBS verdünnt)

Mouse-OPC-Sato + GF

Folgende Reagenzien wurden im angegebenen Verhältnis zusammengegeben:

- 40 ml DMEM
- 800 µl *27 Supplement*
- 400 µl Sato-Stock
- 400 µl PSG
- 400 µl NAC-Lösung
- 40 µl Insulin-Lösung

- 40 µl Trace Element B
- 4 µl Biotin-Lösung

Anschließend wurden die Reagenzien auf dem Schüttler gemischt und durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert. 4 µl Forskolin-Lösung wurde zugegeben und das Medium manuell gut gemischt.

Da sich der Überlebensfaktor NT3 (5 µg/ml in PBS) und der Proliferationsfaktor PDGF-AA (10 µg/ml in dH₂O) im Medium schnell abbauen, wurden diese erst vor Nutzung des Mediums in einer Konzentration von jeweils 1 µl/ml Medium zugegeben. Das so präparierte Mouse-OPC-Sato + GF war drei bis vier Tage bei 4 °C lagerungsfähig.

Differenzierungsmedium

Das Differenzierungsmedium wurde analog zu dem Mouse-OPC-Sato + GF hergestellt, hier wurde jedoch statt des Proliferationsfaktors PDGF-AA das neurotrophe Zytokin CNTF (10 µg/ml in 0,2%igem BSA) in der Konzentration 1 µl/ml dem Medium zugegeben.

Passagier-Lösungen

High Ovomuroid-Lösung

Folgende Reagenzien wurden im angegebenen Verhältnis zusammengegeben:

- 25,05 ml PBS
- 1,5 g BSA
- 1,5 g Trypsin-Inhibitor Ovomuroid

Anschließend wurde die Mischung durch einen 0,22 µm-Filter filtriert und 1 ml der Lösung in 20 ml DMEM pipettiert.

Trypsin-Lösung

Bestehend aus

- 50 mg Trypsin
- 20 ml EBSS

OPC-Isolations-Lösungen

BSA-Verdünnung

Um BSA auf 20% bzw. 0,2% zu verdünnen, wurde eine entsprechende Quantität PBS zugegeben, der pH mit 1 N NaOH auf 7,4 reguliert und durch einen Sterilfilter mit dem Durchmesser 0,22 µm filtriert.

DNase-Verdünnung

Um die DNase auf 0,4% zu verdünnen, wurden folgende Reagenzien zusammengegeben:

- 20 mg DNase
- 5 ml DMEM

Reagenzien-Verdünnung mit dH₂O

MgSO₄ auf 100 mM
Glucose auf 30%
EGTA auf 0,5 M
NaHCO₃ auf 1 M

Papainpuffer

Folgende Reagenzien wurden im angegebenen Verhältnis zusammengegeben:

- 20 ml EBSS
- 2 ml 100 mM MgSO₄
- 2,4 ml 30%ige Glucose
- 0,8 ml 0,5 M EGTA
- 5,2 ml 1 M NaHCO₃
- 169,6 ml dH₂O

Anschließend wurde die Mischung durch einen 0,22 µm-Filter filtriert.

Papainpuffer + Papain

Zu 10 ml Papainpuffer wurden 152 U Papain gegeben, zur Bestimmung von 152 U Papain wurde folgende Rechnungsformel verwendet:

$$165 \text{ U} / * \text{ U} / \text{ ml} = \text{ ___ ml}$$

(* vom Hersteller angegeben)

Papain-Enzyminhibitor

Folgende Reagenzien wurden im angegebenen Verhältnis zusammengegeben:

- 50 ml EBSS
- 6 ml 30%ige Glucose
- 13 ml NaHCO₃ (1M)
- 431 ml dH₂O

Anschließend wurde die Mischung durch einen 0,22 µm-Filter filtriert.

Panning-Puffer

Bestehend aus

- 30 ml 0,2%iges BSA
- 30 µl 10 x Insulin (50 mg/ml)

High Ovomuroid

Folgende Reagenzien wurden im angegebenen Verhältnis zusammengegeben:

- 25,05 ml PBS
- 1,5 g BSA
- 1,5 g Trypsin-Inhibitor Ovomuroid

Anschließend wurde die Mischung durch einen 0,22 µm-Filter filtriert.

Low Ovomucoïd

Folgende Reagenzien wurden im angegebenen Verhältnis zusammengegeben:

- 66,7 ml PBS
- 1,0 g BSA
- 1,0 g Trypsin-Inhibitor Ovomucoïd

Anschließend wurde die Mischung durch einen 0,22 µm-Filter filtriert.

MTT-Lösung

MTT-Verdünnung

Folgende Reagenzien wurden im angegebenen Verhältnis zusammengegeben:

- 5 mg MTT
- 1 ml PBS

Die MTT-Lösung wurde vor Licht geschützt und bei 4 °C gelagert.

BrdU-Lösungen

Anti-BrdU-POD-Stock

Anti-BrdU-POD aus dem BrdU-Kit wurde in 1,1 ml dH₂O für 10 Minuten gelöst und gut gemischt.

Anti-BrdU-POD-Working-Solution

Anti-BrdU-POD-Stock wurde mit Antibody-Dilution-Solution im Verhältnis 1:100 verdünnt.

BrdU-Labeling-Solution

BrdU-Labeling-Reagenz aus dem BrdU-Kit wurde 1:100 mit sterilem Kulturmedium (Mouse-OPC-Sato + GF) verdünnt.

BrdU-Waschlösung

Wasch-Puffer-Konzentrat aus dem BrdU-Kit wurde 1:10 mit sterilem H₂O verdünnt.

cDNA-Synthese-Lösung

Master Mix für Real Time PCR

Bestehend aus

RT Puffer (10x)	2 µl x Probenanzahl x 1,1
dNTP Mix 100 mM (10x)	0,8 µl x Probenanzahl x 1,1
RT <i>random primer</i> (10x)	2 µl x Probenanzahl x 1,1
Multiscribe Reverse Transkriptase	1 µl x Probenanzahl x 1,1
Nukleasefreies H ₂ O	4,2 µl x Probenanzahl x 1,1

ICC-Lösung

Mowiol-DAPI-Lösung

Bestehend aus

- 2 µl DAPI-Stock Solution (1 mg DAPI / ml PBS)
- 998 µl Mowiol

2.2.2 Ansatz der Medikamentenlösung

Die Löslichkeit des kristallinen ASS Pulvers wurde von der Herstellerfirma Sigma-Aldrich in H₂O mit maximal 10 mg/ml angegeben, in Ethanol (EtOH) mit 50 mg/ml. Um mit der Molarität von ASS (180,16 mg/mmol) eine Stocklösung von 200 mM erreichen zu können, muss die Löslichkeit mindestens 36 mg/ml betragen, weshalb primär EtOH als Lösungsmittel getestet wurde.

Da sich ASS in Laugen ebenfalls löst, wurde eine Natronlauge aus 10 ml H₂O und 500 µl 5 M NaOH hergestellt, in der 378 mg ASS hydrolysiert wurden. Die hierbei entstehende Salicylsäure (+ Natriumacetat) ist der aktive Metabolit der Acetylsalicylsäure, weshalb diese Dissoziation nicht von pharmakologischer Bedeutung ist (204). Um ein mögliches Bias durch einen veränderten pH-Wert zu vermeiden, wurde die Acetylsalicylsäurelösung mit HCl auf einen pH-Wert von 7,4 titriert.

Als Kontrolllösung wurde die hergestellte Natronlauge mit HCl ebenfalls auf einen pH von 7,4 titriert.

Die Acetylsalicylsäurekonzentrationen der durchgeführten Versuche wurden, in Anlehnung an bekannte Literatur, auf 0,5 mM ASS und 5 mM ASS festgelegt (3). Die Kontrollgruppen wurden jeweils mit dem selben Volumen Kontrolllösung (Kontrollgruppe 0,5 mM ASS / Kontrollgruppe 5 mM ASS) bzw. mit reinem Medium (0 mM ASS) behandelt. So ergaben sich folgende 5 Stimulationsgruppen:

- 0 mM ASS
- 0,5 mM ASS
- Kontrollgruppe 0,5 mM ASS
- 5 mM ASS
- Kontrollgruppe 5 mM ASS

2.2.3 Beschichtung der Kulturflaschen

T 75-Kulturflaschen wurden über Nacht mit 8 ml Poly-L-Lysin (PLL) inkubiert. Am folgenden Tag wurde das PLL abgenommen und die Flaschen dreimal mit sterilem H₂O gewaschen. Die Flaschen wurden 4 Stunden geöffnet, unter der sterilen Werkbank zum Trocknen aufgestellt und anschließend verschlossen aufbewahrt. Die Haltbarkeit betrug für die beschichteten Flaschen zwei Wochen bei Raumtemperatur.

2.2.4 Isolierung primärer Zellen aus P6-P9 C57BL/6-Mäusen

Die Isolierung der oligodendroglialen Zellen erfolgte durch einen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Kuhlmann (Universitätsklinikum Münster, Institut für Neuropathologie) wie folgt:

Einen Tag vor der Präparation wurde eine Positiv-Selektionsschale vorbereitet: In eine Petrischale für Bakterienkulturen wurden 10 ml PBS + 30 µl des sekundären Positivantikörpers *goat-anti-rat IgG* (Ziege-anti-Ratte IgG) gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Zwei Stunden vor der Präparation wurde der sekundäre Positivantikörper abgenommen und die Schale mit PBS gewaschen, woraufhin 10 ml 0,2%iges BSA und der primäre Antikörper *rat-anti-mouse CD140a* (Ratte-anti-Maus CD140a) auf

die Petrischale pipettiert wurden. Ebenfalls zwei Stunden vor der Präparation wurde die Negativ-Selektionsschale vorbereitet, indem 10 ml PBS + 10 µl Griffonia Lektin 1 (BSL1) in eine Petrischale für Bakterienkulturen gegeben wurde. Diese wurde in den folgenden zwei Stunden intermittierend geschwenkt.

Zur Isolation der primären Zellkulturen von OPCs wurden C57BL/6-Mäuse P6-P9 präpariert. Dazu wurde der Kopf der Tiere abgetrennt und in einer Petrischale für Zellkulturen mit 70%iger Ethanollösung (verdünnt mit dH₂O) gewaschen. Die Gehirne wurden mit Schere und Pinzette freigelegt und in eine weitere sterile Petrischale für Zellkulturen mit PBS gelegt. Unter dem Mikroskop wurden alle sichtbaren Meningen und Blutgefäße sowie Riechbulbi und das Kleinhirn entfernt und die so präparierten Großhirne in eine weitere PBS enthaltende Petrischale für Zellkulturen gelegt. Unter der Sterilbank wurden diese in eine Kavität einer 6-Kavitäten-Mikrotiterplatte (MP) überführt und 1 ml Papainpuffer + Papain zugegeben. Die Gehirne wurden mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und 15-20 Min. in einer kurz vorher vorbereiteten und 2 Min. im Wasserbad erwärmten Lösung aus 2 mg L-Cystein-Hydrochlorid, 9 ml Papainpuffer und 100 µl 0,4%iger DNase bei 37 °C inkubiert, um die Zellverbände zu lösen. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zu den festen Bestandteilen wurde 2 ml High Ovomuroid hinzugegeben, um die chemische Lösung der Zellverbände zu stoppen. Die Platte wurde kurz geschwenkt und der Überstand erneut verworfen. 3-5 ml Low Ovomuroid wurden nun auf die Zellverbände gegeben, diese in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und die Masse mit einer 5 ml-Pipette resuspendiert, um die Zellverbände mechanisch weiter zu lösen, wobei die Bildung von Luftblasen vermieden werden sollte. Nach Absinken der festen Bestandteile wurde der Überstand mit den gelösten Zellen in ein neues Zentrifugenröhrchen (50 ml) pipettiert. Mit einer 1 ml-Pipette wurden die noch verbleibenden Zellverbände nach Zugabe von ca. 3 ml Low Ovomuroid erneut resuspendiert und die vorherigen Schritte so häufig wiederholt, bis sich makroskopisch keine Zellverbände mehr zeigten. Die Zellsuspension wurde in 2 x 15 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 1000 rpm 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellmasse in den Röhrchen belassen und auf diese jeweils 6-8 ml Panning-Puffer gegeben. Das Zellpellet wurde anschließend mit einer 5 ml-Pipette resuspendiert und alle Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Kurz vor Zugabe der Zellen wurde die Petrischale zur Negativ-Selektion abgesaugt und die Zellen 15 Min. erschütterungsfrei bei Raumtemperatur inkubiert, so dass das auf dem Petrischalenboden haftende Lektin Mikrogliazellen und Makrophagen binden konnten. Die Positiv-Selektionsschale wurde abgesaugt, mit PBS gewaschen und der Überstand der Negativ-Selektionsschale mit den nicht gebundenen Zellen wurde in die Schale gegeben. Die Zellen wurden für 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die OPCs banden nun an den Ak und der Überstand konnte abgesaugt und verworfen werden. Die Positiv-Selektionsschale wurde sechsmal mit EBSS gewaschen und abgesaugt, und die Zellen anschließend mit 5 ml Trypsin-Lösung für 5 Min. bei 37 °C enzymatisch vom Schalenboden gelöst. Zusätzlich erfolgte eine mechanische Ablösung der Zellen durch vorsichtiges Klopfen. Die Schale wurde mehrmals mit 5 ml High Ovomuroid gespült und die gelösten Zellen in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Der Vorgang wurde mehrfach mit EBSS wiederholt. Das Röhrchen wurde bei 1000 rpm 6 Min. abzentrifugiert, der Überstand bis auf 2 ml abgesaugt und mit einer 1000 µl Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden in zwei Zellkulturflaschen (75 cm²) mit jeweils 8 ml Mouse-OPC-Sato + GF ausplattiert.

2.2.5 Kultivation der Zellen und Mediumwechsel

Die primäre OPC-Zellkultur wurde in PLL-beschichteten Zellkulturflaschen (75 cm²) mit 8-10 ml Mouse-OPC-Sato + GF im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Je nach Konfluenz wurden täglich 10-15 µl PDGF-AA (10 µg/ml in dH₂O) zugegeben und die Flaschen per Hand vorsichtig geschwenkt. Alle zwei Tage wurde die Hälfte des Kulturmediums gewechselt, wobei 4-5 ml Medium abpipettiert und ebensoviel frisches Mouse-OPC-Sato + GF zugegeben wurde.

2.2.6 Passagieren der Zellen

Um die kultivierten Zellen zu passagieren, wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Kulturflasche einmal mit EBSS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 3 ml Trypsin-Lösung zugegeben und bei 37 °C 3 Min. inkubiert. Durch die Zugabe von 3 ml High Ovomuroid-Lösung wurde die Trypsin-Lösung inaktiviert. Anschließend wurde der Flaschenboden mehrfach mit einer 5 ml-Pipette abgespült und die gelösten OPCs in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml) bei 1000 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt. Um die Zellverbände

physikalisch zu lösen, wurde das geschlossene Röhrchen 2-3 mal über das Absauggitter der Sterilbank geführt und anschließend mehrfach mit der 1000 µl-Pipette resuspendiert. Zum nachfolgenden Ausplattieren der Zellen wurde die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt (s. Kapitel 2.2.7) und die Zellen je nach benötigter Zelldichte in Kulturmedium (Mouse-OPC-Sato + GF) in MP (350 µl oder 500 µl / Well) oder 75 cm²-Kulturflaschen (8-10 ml) ausgesät.

2.2.7 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension (s. Kapitel 2.2.6) mit 10 µl Trypanblau versetzt und hiervon 10 µl unter das vorbereitete Deckglas der Neubauer Zählkammer pipettiert. Die Auszählung der aufgrund ihrer intakten Zellwand nicht gefärbten, also vitalen Zellen erfolgte am Lichtmikroskop. Die gezählten Zellen der vier Quadranten der Zählkammer, jeweils unterteilt in weitere 16 Felder, wurden mit nachfolgender Rechnung auf die Zellzahl pro 1 ml hochgerechnet:

Summe der Zellen aus 4 Quadranten ÷ 4 x 2 x 10.000 = Zellzahl / ml

Um eine gewünschte Zellzahl / ml in einem bestimmten Volumen zu erreichen, wurde folgende Rechnung benutzt:

Errechnete Zellzahl pro ml ÷ gewünschte Zellzahl pro ml = Verdünnungsfaktor

Gewünschtes Volumen (ml) ÷ Verdünnungsfaktor

= **benötigtes Volumen Zellsuspension (ml)**

Gewünschtes Volumen (ml) - benötigtes Volumen Zellsuspension

= **benötigtes Volumen Kulturmedium (ml)**

Die errechneten Volumina Kulturmedium und Zellsuspension wurden zusammengegeben und in Zellkulturflaschen bzw. Mikrotiterplatten ausgesät.

2.2.8 MTT-Test

Der MTT-Test nach Mosmann et al. (212) dient der Messung der mitochondrialen Respiration der behandelten Zellen und kann somit als Zytotoxizitätstest bzw. Vitalitätstest eingesetzt werden. Das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz Dimethyl-Thiazolyl-Diphenyltetrazolium-Bromid (MTT) wird in vitalen Zellen von der mitochondrialen Succinatdehydrogenase (endoplasmatisches Enzym) zu fliederfarbenem Formazan reduziert, welches fotometrisch mittels ELISA gemessen werden kann und dessen Intensität proportional zur Vitalität der Zellen ist.

Es wurden 25.000 Zellen pro Kavität einer 24-Kavitäten-MP in 350 µl Kulturmedium (Mouse-OPC-Sato + GF) ausgesät, drei Stunden später weitere 150 µl Kulturmedium / Kavität zugegeben und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen als Triplets mit entsprechenden Medikamentenkonzentrationen im Kulturmedium weitere 48 Stunden (nach 24 Stunden Medikamenten- und Mediumswechsel) stimuliert.

Zur Absorptionsmessung wurde das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt, die MTT-Lösung 1:10 mit Kulturmedium weiter verdünnt und 350µl / Kavität zugegeben. Die Zellen wurden eine Stunde im Brutschrank inkubiert, die MTT-Lösung anschließend abgesaugt und das fliederfarbene Formazan mittels 250 µl Isopropanol / Kavität aus den Zellen gelöst. Hierzu wurde die MP 10 Min. auf den Schüttler gestellt. Aus jeder Kavität wurden 2 x 80 µl in je eine Kavität einer 96er MP umpipettiert und im Multiwell-Spektrometer (*ELISA-reader*) die Absorption bei 570 nm gemessen.

2.2.9 BrdU-Test

Dieser *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA-Test) wird zur Messung der Zellproliferation eingesetzt. Er beruht auf dem Einbau des künstlichen Thymidinanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin während der DNS-Synthese. Die Menge des BrdU wird nach antikörpervermittelter Markierung und enzymatischer Umwandlung des zugegebenen Substrates Tetramethylbenzidin fotometrisch gemessen und korreliert direkt mit der Zellproliferation (203). Es wurde das BrdU-Kit (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*) der Firma Roche Applied Science benutzt.

Es wurden 8.000 Zellen pro Well einer 48-Kavitäten-MP in 350 µl Kulturmedium (Mouse-OPC-Sato + GF) ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen als Triplets mit entsprechenden Medikamentenkonzentrationen im Medium weitere 48 Stunden stimuliert, wobei nach 24 Stunden ein Medikamenten- und Mediumswechsel vorgenommen wurde. Zusätzlich wurden drei Kavitäten ausschließlich mit Medium für den Korrekturwert (*blank*) gefüllt, was der Bindung des BrdU an die MP entspricht. Aus jeder Kavität wurden 150 µl Medium abgenommen, 20 µl der vorbereiteten BrdU-Labeling-Solution zupipettiert und die Zellen im Brutschrank sechs Stunden inkubiert. Drei Kavitäten wurden nicht *gelabelt*, diese bildeten den Korrekturwert (*background*), was der Bindung des Antikörpers an die Zellen ohne BrdU-Zusatz entspricht.

Anschließend wurde die Platte abgesaugt und 200 µl / Kavität Fix-Denat aus dem BrdU-Kit zugegeben. Nach 30 Min. wurde die Platte auf vorbereiteten Papiertüchern ausgeleert und umgedreht abgeklopft. Die nun zuzugebende Anti-BrdU-POD-Working-Solution (200µl / Kavität) musste unmittelbar vorher vorbereitet werden und verblieb 90 Min. bei Raumtemperatur auf den Zellen. Zum Entfernen wurde diese analog zum Fix-Denat auf Papiertüchern umgedreht und abgeklopft. Die Zellen wurden anschließend drei Mal mit 300 µl BrdU Waschlösung gewaschen, woraufhin sie mit 200µl / Kavität Substrat-Solution aus dem BrdU-Kit für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Aus jeder Kavität wurden nun 2 x 80 µl entnommen, in je eine Kavität einer 96er Mikrotiterplatte gegeben und 25 µl H₂SO₄ zupipettiert. Die Absorption wurde im Multiwell-Spektrometer (ELISA-reader) bei 450 nm und 690 nm gemessen und die Werte der ersten Messung (450 nm) von den Werten der zweiten Messung (690 nm) subtrahiert. Die Korrekturwerte (*blank* und *background*) wurden von der Differenz subtrahiert; der so ermittelte Wert ist ein Maß für die DNS-Synthese.

2.2.10 Differenzierungszeitachse

Zur Analyse der Differenzierung von OPCs zu ausdifferenzierten Oligodendrozyten wurde eine Differenzierungszeitachse unter Medikamentenstimulation angelegt. Auf

Ausdrucken konnten die Zellfortsätze ausgezählt und anhand der Anzahl den Entwicklungsstufen zugeordnet werden.

Oligodendrozytenprogenitorzellen	0-2 Zellfortsätze	
Unreife Oligodendrozyten	3-13 Zellfortsätze	 
Reife Oligodendrozyten	> 13 Zellfortsätze	 
Sterbende Oligodendrozyten		

Es wurden 12.500 Zellen pro Well einer 48-Kavitäten-MP in 350 µl Kulturmedium (Mouse-OPC-Sato + GF) ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit entsprechenden Medikamentenkonzentrationen im Differenzierungsmedium stimuliert. Nach 6, 24, 30 und 48 Stunden wurden die Zellen mit der Mikroskopkamera unter 10-facher Vergrößerung fotografiert und die Zellfortsätze manuell ausgezählt.

2.2.11 Myelingenexpressionsanalyse

Zwecks Objektivierung der mikroskopischen Beobachtungen zur Differenzierung der OPCs kann die Auswertung der Expression der Myelin assoziierten Gene herangezogen werden.

Hierzu wurden Zellen zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten geerntet, die Boten-RNA (mRNA) extrahiert, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (q-RT-PCR) die Expressionsrate bestimmt. Für diese Versuche wurden die Versuchskits *GenElute*

Mammalian Total RNA Miniprep Kit der Firma Sigma-Aldrich und *High Capacity cDNA-Synthesis-Kit* der Firma Applied Biosystems benutzt.

RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion müssen die geernteten Zellen mechanisch und enzymatisch aufgespalten, an eine Säule gebunden und nach mehreren Waschvorgängen von dieser wieder gelöst werden.

In 75 cm²-Zellkulturflaschen wurden OPCs ausgesät und in Kulturmedium (OPC-Sato + GF) unter täglicher PDGF-AA-Zugabe zur Proliferation gebracht (bis zu einer Dichte von ca. 300.000 Zellen / Kulturflasche).

Das Differenzierungsmedium wurde mit entsprechenden Medikamentenkonzentrationen versetzt und die Zellen hiermit stimuliert. Nach 6, 24 und 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, indem sie mit EBSS gewaschen und anschließend in weiteren 5 ml EBSS mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgeschabt wurden. Die Zellen wurden in einem Zentrifugenröhrchen 7 Min. bei 1.000 rpm zentrifugiert und der komplette Überstand verworfen. Das Zellpellet kann im Zentrifugenröhrchen bei -80 °C gelagert werden. Für jede Probe wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Zur Zelllyse wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, 5 ml RNase-freies PBS zugegeben, um das Zellpellet zu lösen und das Zentrifugenröhrchen mit 300 rpm 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die verbleibenden Zellen auf dem Schüttler gemischt und 500 µl Lysin-Lösung / Mercaptoethanol-Mix zupipettiert. Erneut wurde die Mischung auf dem Schüttler gemischt und zur weiteren Zerschering die Zellmasse 5 Mal durch eine feine Kanüle gespritzt.

Das Zelllysat wurde auf eine Filtersäule in einem 2 ml-Sammelröhrchen des RNA-Kits gegeben und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zum gefilterten Lysat wurden 500 µl 70%iges Ethanol pipettiert und ein weiteres Mal auf dem Schüttler gemischt, bevor es auf eine Bindungssäule pipettiert wurde und mit 13.000 rpm 15 Sek. an die Säule gebunden wurde. Der Durchfluss wurde verworfen. Um die Desoxyribonukleinsäure (DNS) zu verdauen, wurde die Säule mit 250 µl Waschlösung 1 des RNA-Kits 15 Sek. mit 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Bindungssäule anschließend 15 Min. bei Raumtemperatur mit einer Mischung aus 10 µl DNase 1 (D2816) + 70 µl DNase Digest-Puffer (D1556) inkubiert. Erneut wurde die

Säule mit 250 µl Waschlösung 1 des RNA-Kits mit 13.000 rpm 15 Sek. zentrifugiert, in ein neues 2 ml-Sammelröhrchen umgesetzt und ein weiteres Mal mit 500 µl Waschlösung 1 zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zwei weitere Waschungen mit 500 µl Waschlösung 2 und Zentrifugation bei 13.000rpm für 15 Sek. und 2 Min. folgten.

Zur Lösung der RNA von der Säule wurde diese in ein neues Sammelröhrchen umgesetzt und mit 50 µl der Elutionslösung des Kits 1 Min. mit 13.000 rpm zentrifugiert.

Der RNA-Gehalt der Lösung wurde mit dem Nano Drop gemessen. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

cDNA-Synthese aus mRNA

Die cDNA-Synthese von mRNA (diese in in den RNA-Proben enthalten) erfolgt u.a. durch die Zugabe von Primern und Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs), die anhand der mRNA-Sequenz eine komplementäre cDNA schreiben. Diese ist weitaus stabiler als die mRNA und kann anschließend in der q-RT-PCR amplifiziert werden.

Die Umschreibung der cDNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Von allen zu vergleichenden RNA-Proben wurde die gleiche RNA-Menge in cDNA umgeschrieben. Um das benötigte Volumen der jeweiligen RNA-Lösung zu errechnen, wurde die gewünschte Konzentration durch die im Nano Drop gemessene dividiert und zum Reverse-Transkriptions-Master-Mix hinzugegeben. Anschließend wurde der jeweilige Reaktionsansatz mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt.

Um die mRNA in cDNA umzuschreiben, wurden demnach

- 10 µl Reverse-Transkriptions-Master-Mix
- + errechnetes Volumen Probe
- + errechnetes Volumen H₂O

zusammengegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert, um sicher zu gehen, dass das gesamte Volumen sich in der Spitze der Reaktionsgefäße befand. Die Proben wurden im Thermocycler bei 25 °C 10 Min., bei 37 °C 120 Min. und bei 85 °C 5 Min. erhitzt.

Zu den fertigen cDNA-Proben wurden anschließend 180 µl H₂O pura pipettiert. Die Proben waren so bei -20 °C lagerungsfähig.

Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (q-RT-PCR)

Eine Kombination aus herkömmlicher PCR und der Quantifizierung der entstandenen Genprodukte ist die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (q-RT-PCR).

Hierbei wird die zu untersuchende DNS mithilfe von vorwärts und rückwärts laufenden Primern amplifiziert und zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff, hier SYBR-Green, eingebaut, dessen Intensität fotometrisch während des PCR-Laufs gemessen werden kann. Mithilfe eines Standardprimers zur Quantifizierung eines *house keeping* Gens, hier *Rplp*, wird die gemessene Fluoreszenz und damit der DNS-Gehalt der Proben relativ quantifiziert.

Pro cDNS-Probe und Negativkontrolle wurde folgende Mischung angesetzt:

1 µl	cDNA
+ 10 µl	SYBR-Green Master Mix (2x)
+ 0,14 µl	Primer Vorwärts (<i>RplpO/Mbp/Plp</i>)
+ 0,14 µl	Primer Rückwärts (<i>RplpO/Mbp/Plp</i>)
+ 8,72 µl	H ₂ O aus dem Reinstwasserfilter MilliQ

Der PCR-Ansatz wurde in eine 96-Kavitäten-PCR-MP für q-RT-PCR pipettiert. Pro Primer und Platte wurde eine Negativkontrolle mit 1 µl H₂O statt DNS-Probe angelegt. Anschließend wurde die Platte mit der selbsthaftenden Folie des Kits verschlossen und bei 4.100 rpm 1 Min. zentrifugiert. Mit folgendem Programm wurden die Proben im StepOne Cycler amplifiziert:

40 Zyklen, jeweils:

15 Sek.: 90 °C, 15 Sek.: 55 °C, 1 Min.: 72 °C

Der StepOne Cycler detektierte zudem die Fluoreszenzsignale, durch die auf die Ursprungsmenge cDNA rückgeschlossen werden kann (s. Kapitel 2.2.13).

2.2.12 Immunozytochemie (ICC)

Die Immunzytochemie kann genutzt werden, um Myelinproteine und Reifemarker in differenzierten Oligodendrozyten antikörpervermittelt anzufärben und den Grad der Differenzierung visuell zu beobachten. Die unterschiedlichen Stimulationsgruppen der differenzierten Oligodendrozyten können sowohl untereinander als auch mit undifferenzierten OPCs verglichen werden.

In 5 Kavitäten einer 24-Kavitäten-MP wurden auf PLL-beschichtete Runddeckgläschen 8.000 Zellen in 180 µl ausgesät und nach einer Absenzzeit von einer Stunde weitere 320 µl Kulturmedium Mouse-OPC-Sato + GF zugegeben. Ein Runddeckgläschen wurde nach einer Anwachszeit von sechs Stunden mit undifferenzierten Zellen fixiert und angefärbt (s.u.). Das Medium der übrigen Zellen wurde abgesaugt und die Zellen mit den entsprechenden Medikamentenkonzentrationen in Mouse-OPC-Sato + GF bis zur Differenzierung weitere drei Tage ohne Wechsel des Mediums oder Zugabe von GF kultiviert (37 °C, 5% CO₂). Anschließend wurden auch diese Zellen fixiert und gefärbt.

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 4%igem PFA 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Drei weitere Male wurden die Zellen mit PBS gewaschen und konnten hierin bei 4 °C luftdicht verschlossen gelagert werden. Zur Färbung wurde das PBS von den Zellen abgenommen und die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Pro Kavität wurden ca. 300µl 0,5%iges Triton X-100 (in PBS) zugegeben um die Zellen zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Zellen drei Mal je fünf Minuten mit PBS auf dem Rüttler gewaschen und mit 5%igem fetalem Kälberserum (FCS) in PBS für ca. 30 Min. bis eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primärantikörper wurden 1:200 (*anti-MBP rat*) und 1:300 (*anti-CD140 rabbit*) mit 5%igem FCS in PBS verdünnt. Der Deckel einer 24-Kavitäten MP wurde mit Parafilm bedeckt und darauf die Primärantikörper in Tropfen (15µl) aufgebracht. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten auf die Tropfen gelegt und über Nacht im Kühlschrank (4 °C) in einer weiteren Box inkubiert, sodass sie vor dem Austrocknen geschützt waren. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach oben in die 24-Kavitäten MP gelegt und drei Mal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden 1:250 mit 5%igem FCS in PBS verdünnt und wie die Primärantikörper (s.o.) auf eine Parafilmbeschichtete 24-Kavitäten MP getropft. Anschließend wurden die

Deckgläschen erneut verkehrt herum auf die Tropfen gelegt und eine Stunde bei Raumtemperatur vor Licht und vor dem Austrocknen geschützt, inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Deckgläschen wurden in die 24-Kavitäten MP gelegt, drei Mal mit PBS für je 5 Minuten gewaschen und in klares Wasser getunkt. Das verbliebene Wasser nach dem Abtropfen wurde mit einem Zelltuch abgenommen und die Deckgläschen wurden mit Mowiol-DAPI-Lösung (ca. 8 µl) auf Objektträgern eingedeckelt. Diese wurde eine halbe Stunde bei Raumtemperatur trocknen gelassen und anschließend bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert. Die immunzytochemisch gefärbten Zellen wurden anschließend an der Mikroskopkamera mit 10- und 40-facher Vergrößerung fotografiert und kontrastverstärkt. Die Objektträger konnten im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.13 Statistische Auswertung

Der MTT-Test und der BrdU-Test wurden als technische Triplikate angelegt und mit mindestens $n = 3$ Versuchswiederholungen (biologische Replikate) durchgeführt. Die Differenzierungszeitachse und die Myelingenexpressionsanalyse wurden mit $n = 2$ Versuchswiederholungen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit * bezeichnet, wobei * einen p-Wert kleiner als 0,05 (signifikant), ** einen p-Wert kleiner als 0,01 (sehr signifikant) und *** einen p-Wert kleiner als 0,001 (hochsignifikant) anzeigt.

MTT- Test

Die Absorptionmesswerte des ELISA-Spektrometers bei 570 nm wurden mit der Ascent Software 2.6 erfasst. In einer Exceltabelle wurden diese in prozentuale Werte in Bezug auf die Kontrollgruppe 0 mM ASS (= 100%) umgerechnet. Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 5.04. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit *standard error of the mean* (SEM) dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels One-way-ANOVA mit Bonferroni-Post-Test-Korrektur untersucht.

BrdU-Test

Die Absorptionswerte des ELISA-Spektrometers wurden mit der Ascent Software 2.6 erfasst. Der Messwert bei 450 nm wurde von dem zweiten Messwert bei 690 nm mithilfe einer Exceltabelle subtrahiert und von der Differenz die Korrekturwerte (*blank* und *background*) abgezogen. Anschließend wurden diese in prozentuale Werte in Bezug auf die Kontrollgruppe 0 mM ASS (= 100%) umgerechnet. Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 5.04. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Bonferroni-Post-Test-Korrektur untersucht.

Differenzierungszeitachse

Die Zellfortsätze der bei 10-facher Vergrößerung fotografierten Zellen wurden manuell ausgezählt und die Anzahl der Entwicklungsstufen pro 100 Zellen ermittelt. Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 5.04. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Post-Test-Korrektur untersucht.

Myelingenexpressionsanalyse

Die vom StepOne Cycler erfassten Fluoreszenzsignale der exponentiellen Phase der q-RT-PCR wurden mithilfe der StepOne Software auf die Güte der Schmelzkurven hin analysiert. Die Festlegung des *cycle threshold* (engl. f.:Schwellenwert-Zyklus / Ct-Wert), der den ersten Zyklus der exponentiellen Phase des PCR-Laufs angibt, wurde manuell festgelegt. Von dem Ct-Wert kann also auf die Ausgangsmenge cDNA rückgeschlossen werden. Dieser sollte innerhalb der drei Replikate einer Stimulationsgruppe wenig abweichen. Bei zu großen Abweichungen oder fehlender Güte der Schmelzkurve wurden entsprechende Werte von der Analyse ausgeschlossen.

Die Ct-Werte wurden in eine Exceltabelle übertragen, die Mittelwerte der Stimulationsgruppen errechnet und auf den Wert der endogenen Kontrolle (*Rplp0*-Wert) normiert. Die Ergebnisse der Stimulationsgruppen (Δ Ct-Wert) wurden anschließend auf die Kontrollgruppe 0 mM ASS normiert und ergaben so den $\Delta\Delta$ Ct-Wert. Diese Werte wurden nun zur Basis 2 in den Exponenten gesetzt ($2^{-(\Delta\Delta \text{ Ct-Wert})}$) und ergaben die relative Expression der Myelingene im Bezug auf die

Kontrollgruppe 0 mM und die endogene Kontrolle *Rplp0*. Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 5.04. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels One-way-ANOVA mit Bonferroni-Post-Test-Korrektur untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Laborbedingungen

Zur Herstellung der benötigten Acetylsalicylsäure-Lösung (ASS-Lösung) zur Behandlung der C57BL/6 OPCs wurden verschiedene Lösungsmittel getestet.

Im Zytotoxizitätstest (MTT-Test) zeigten die mit Ethanol (EtOH) behandelten Zellen nach 24 Stunden eine deutlich verringerte metabolische Aktivität im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die metabolische Aktivität war bei einer 2%igen EtOH-Behandlung um 31,97% (+/- 7,29%, $p < 0.001$) und bei 4% EtOH um 32,55% (+/- 7,28%, $p < 0.001$) reduziert. Die Inkubation mit einer 2- bzw. 4%igen Natriumhydroxid-Lösung (NaOH-Lösung) hatte keinen negativen Effekt auf die metabolische Aktivität der C57BL/6 OPCs nach 24 Stunden (s. Abb. 3.1).

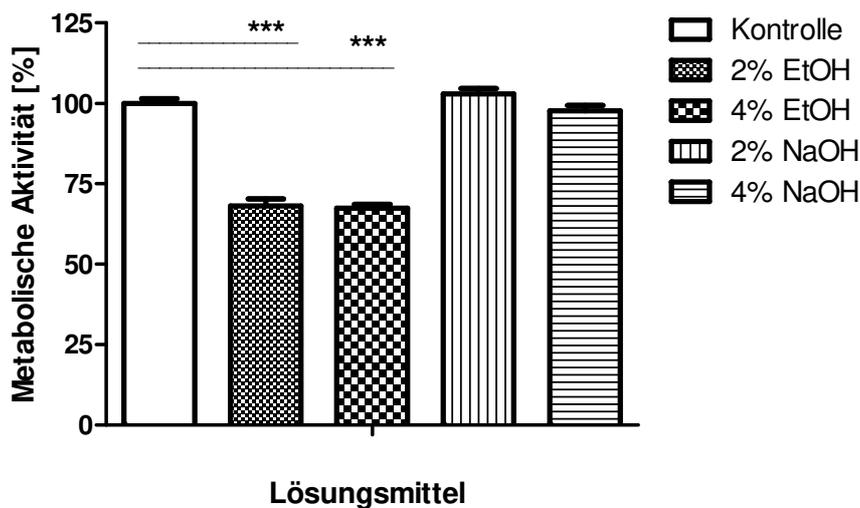


Abb. 3.1: Der Einfluss einer 24-stündigen 2- und 4%igen Ethanol- und Natriumhydroxid-Behandlung auf die metabolische Aktivität (MTT-Test) von C57BL/6 OPCs im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die mit EtOH behandelten Zellen zeigen eine signifikant geringere metabolische Aktivität (2% EtOH zur Kontrolle $p < 0,001$, 4% EtOH zur Kontrolle $p < 0,001$). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.

3.2 Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die metabolische Aktivität primärer OPCs

Die metabolische Aktivität der Stimulationsgruppen wurde mithilfe des MTT-Tests nach 48 Stunden Inkubation mit ASS erfasst. NaOH wurde als Lösungsmittel der pulverförmigen Acetylsalicylsäure verwendet. Die gemessene Absorption der Kontrollgruppe 0 mM ASS wurde als unbehandelte Kontrolle mit einer relativen metabolischen Aktivität auf 100% festgelegt. Die Werte der Stimulationsgruppen wurden dazu in Relation gesetzt und die Signifikanz analysiert. Die Stimulationsgruppen zeigten in der *gepoolten* Ergebniszusammenfassung (n = 3) untereinander keine signifikanten Unterschiede. Alle Stimulationsgruppen hatten nach 48 Stunden eine ähnliche metabolische Aktivität (s. Abb.3.2)

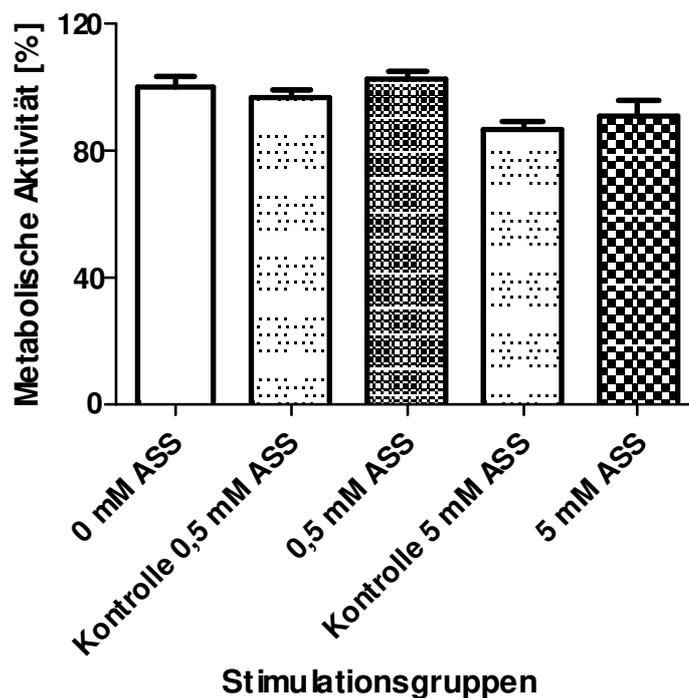


Abb. 3.2: Der Einfluss einer 48-stündigen 0,5 mM und 5 mM ASS-Behandlung auf die metabolische Aktivität (MTT-Test) von C57BL/6 OPCs im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe mit n = 3 Versuchswiederholungen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der metabolischen Aktivität. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.

Es wurde davon ausgegangen, dass sowohl die verwendeten Acetylsalicylsäure-Konzentrationen (bis 5 mM) als auch das Lösungsmittel keinen zytotoxischen Einfluss auf die primären OPCs hatten. Die ASS-Lösung wie auch das Lösungsmittel konnten somit zu weiteren Versuchen verwendet werden. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das Lösungsmittel Einfluss auf die Ergebnisse der weiteren Versuche hatte, wurden zwei separate Kontrollgruppen mitgeführt. Die Kontrollgruppen wurden mit der jeweiligen Menge Lösungsmittel behandelt, die für die angewendete ASS-Konzentration der stimulierten Zellen nötig war. So konnte die Wirkung von Acetylsalicylsäure allein auf die Zellen beobachtet werden.

3.3 Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die Proliferation primärer OPCs

Die Proliferation der Stimulationsgruppen wurde mithilfe des BrdU-Tests nach 48 Stunden Inkubation erfasst. Die jeweilige Kontrollgruppe der Stimulationsgruppen wurde auf 100% Proliferation festgelegt. Die Stimulationsgruppen wurden ins Verhältnis gesetzt und die Signifikanz analysiert. Bei $n = 4$ Versuchswiederholungen zeigte die Stimulationsgruppe 0,5 mM ASS mit 97,19% (+/- 17,69%) zur entsprechenden Kontrollgruppe (Kontrollgruppe 0,5 mM ASS: 100% (+/- 11,91%)) keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 3.3).

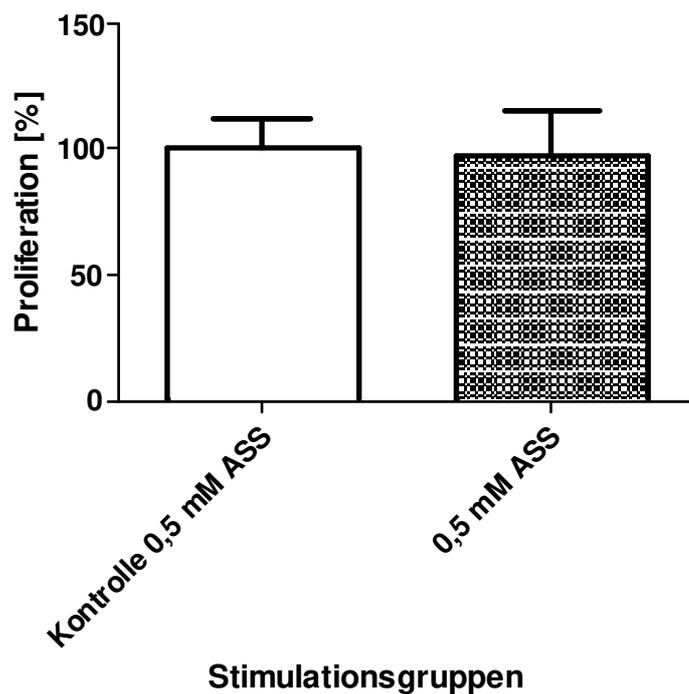


Abb. 3.3: Der Einfluss einer 48-stündigen 0,5 mM ASS-Behandlung auf die Proliferation (BrdU-Test) von C57BL/6 OPCs im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 4$ Versuchswiederholungen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Stimulationsgruppe 5 mM ASS zeigte mit 182,8% (\pm 34,55%) keinen signifikant höheren Prozentualwert zur Kontrollgruppe 5 mM ASS (100% (\pm 22,37%)) (s. Abb. 3.4).

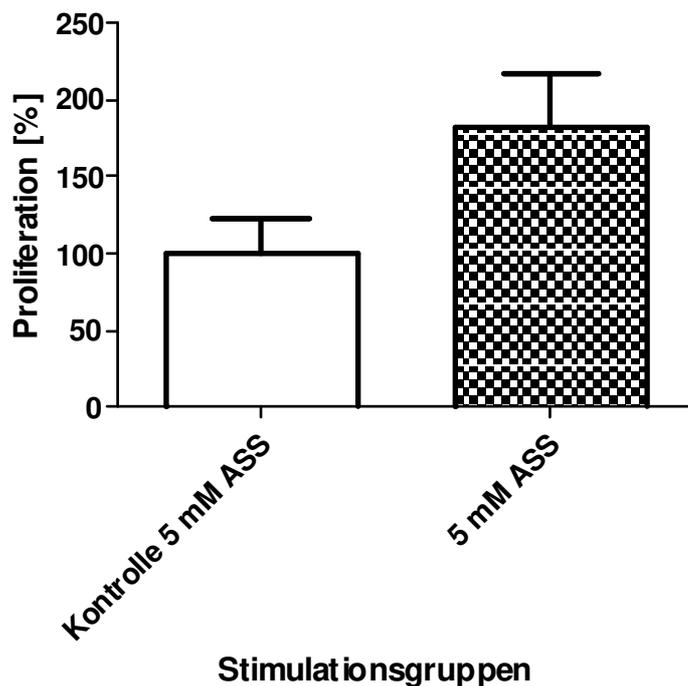


Abb. 3.4: Der Einfluss einer 48-stündigen 5 mM ASS-Behandlung auf die Proliferation (BrdU-Test) von C57BL/6 OPCs im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 4$ Versuchswiederholungen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.4 Differenzierung der primären OPCs unter Acetylsalicylsäure

Die Beurteilung der Differenzierung der OPCs erfolgte auf morphologischer Ebene (Differenzierungszeitachse), auf mRNA-Ebene (Myelingenexpressionsanalyse) und auf Proteinebene (Immunzytochemie).

3.4.1 Differenzierungszeitachse

Zur Beurteilung der Differenzierung wurden die Zellfortsätze der differenzierenden OPCs auf Durchsichtbildern ausgezählt und den Zellen Entwicklungsstufen zugeteilt. Die Differenzierung wird hier anhand der ausgebildeten Zellfortsatzanzahl bestimmt, wobei OPCs als Zellen mit 0-2 Fortsätzen, unreife Oligodendrozyten als Zellen mit 3-13 Fortsätzen und reife Oligodendrozyten als Zellen mit > 13 Fortsätzen festgelegt wurden.

Bei $n = 2$ Versuchswiederholungen wurden in der 0,5 mM ASS Stimulationsgruppe keine signifikanten Unterschiede zur entsprechenden Kontrollgruppe festgestellt (s. Abb. 3.5).

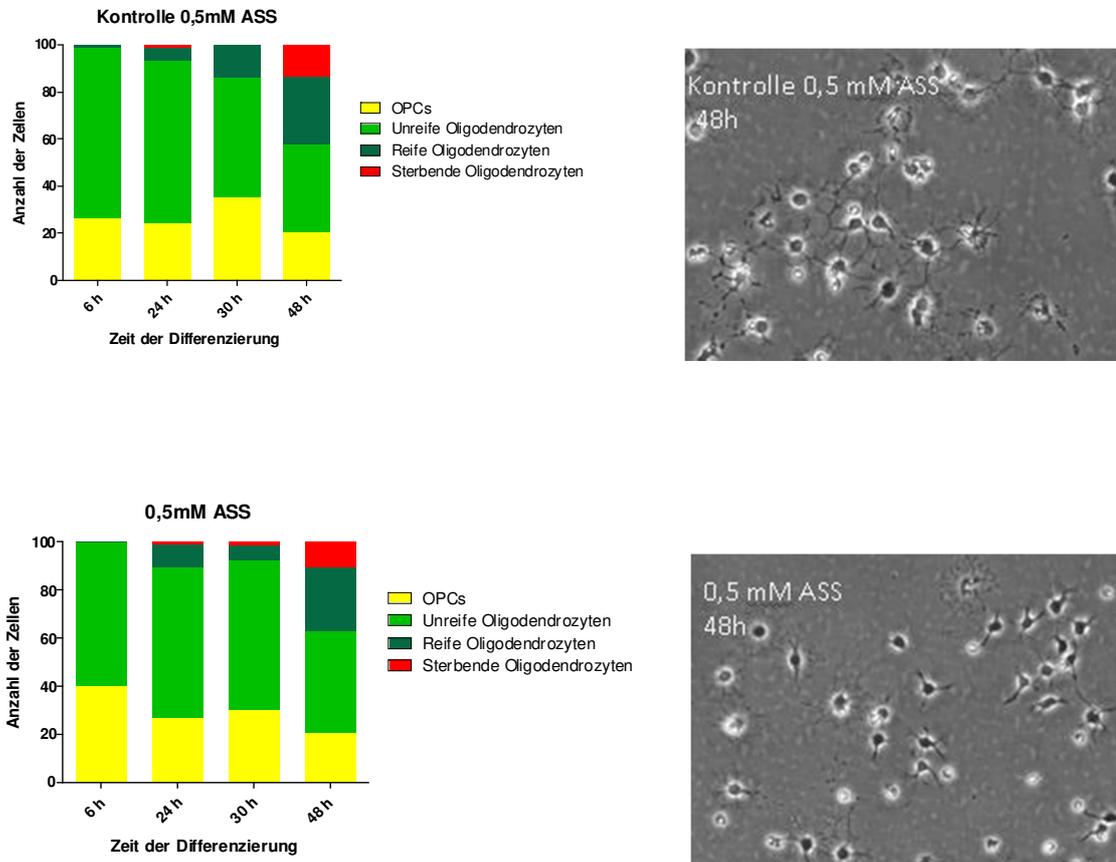


Abb. 3.5: Der Einfluss einer 6-, 24-, 30- und 48-stündigen 0,5 mM ASS-Behandlung auf die Differenzierung von C57BL/6 OPCs zu Oligodendrozyten im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Um die Differenzierung zu untersuchen, wurden jeweils die Zellfortsätze von 100 Zellen auf Durchsichtbildern ausgezählt und den Zellen Entwicklungsstufen zugeteilt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Differenzierung.

Unter 5 mM ASS konnten nach 48 Stunden signifikant mehr unreife Oligodendrozyten (Kontrollgruppe 5 mM ASS: 35 Zellen; 5 mM ASS: 63 Zellen, $p < 0,05$) und weniger reife Oligodendrozyten (Kontrollgruppe 5 mM ASS: 45 Zellen, 5 mM ASS: 11 Zellen, $p < 0,01$) festgestellt werden (s. Abb.3.6).

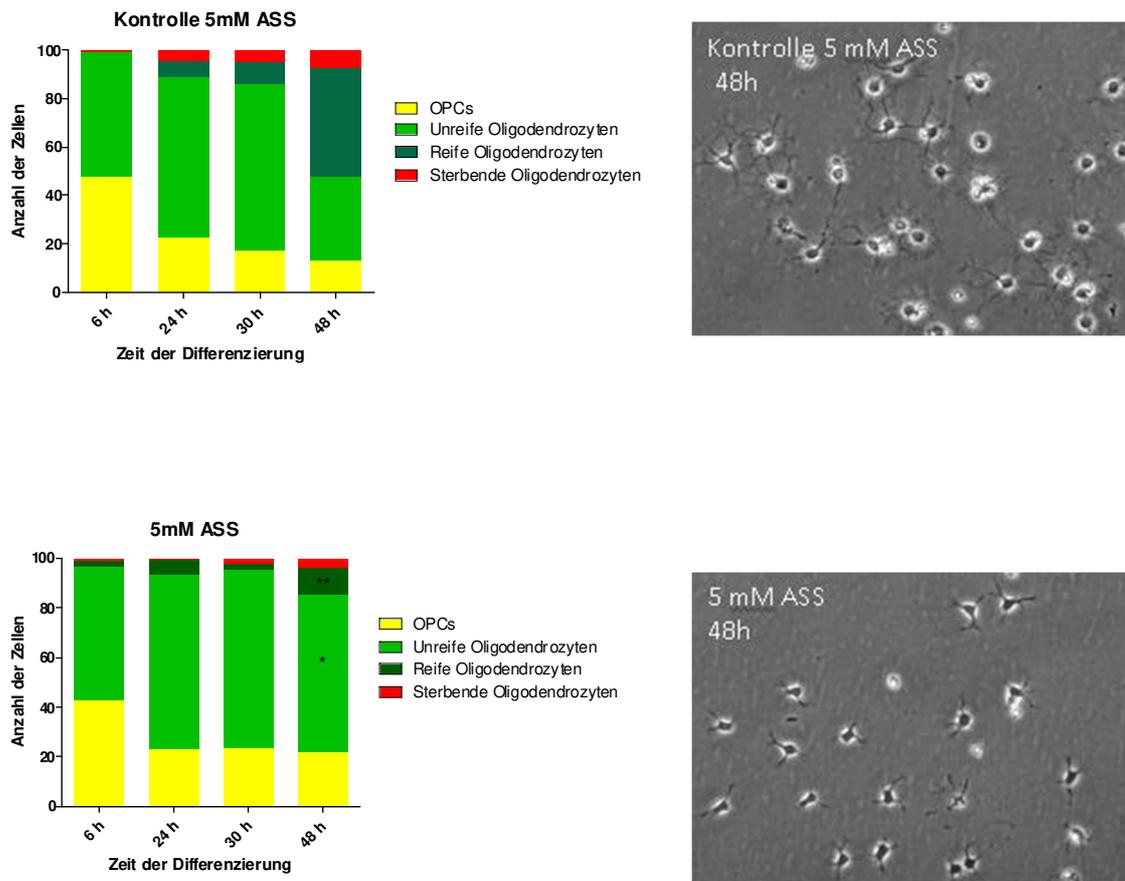


Abb. 3.6: Der Einfluss einer einer 6-, 24-, 30- und 48-stündigen 5 mM ASS-Behandlung auf die Differenzierung von C57BL/6 OPCs zu Oligodendrozyten im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Um die Differenzierung zu untersuchen, wurden jeweils die Zellfortsätze von 100 Zellen auf Durchsichtbildern ausgezählt und den Zellen Entwicklungsstufen zugeteilt. Nach 48 Stunden konnten signifikant mehr unreife ($p < 0,05$) und weniger reife Oligodendrozyten ($p < 0,01$) festgestellt werden.

3.4.2 Analyse der Myelingenexpression anhand einer Quantifizierung des mRNA-Levels

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von OPCs und Oligodendrozyten zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten wurde die mRNA extrahiert, diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe einer q-RT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die 24-Stunden-Werte normiert. Das Augenmerk lag auf dem mRNA-Level der Myelogene *Mag*, *Mbp* und *Plp*. Bei $n = 2$ Versuchswiederholungen hatte 0,5 mM

Acetylsalicylsäure während einer 48-stündigen Differenzierung keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von *Mag*, *Mbp* und *Plp* (s. Abb. 3.7).

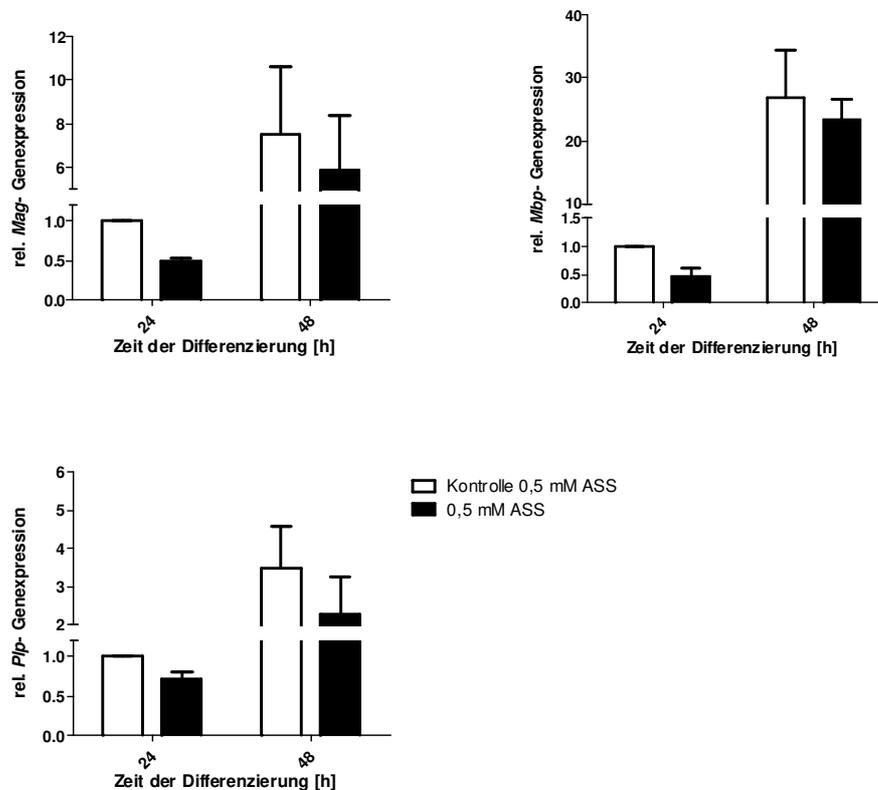


Abb. 3.7: Der Einfluss einer 48-stündigen 0,5 mM ASS-Behandlung auf die Myelingenexpression (q-RT-PCRs mit SYBR-Green) von *Mag*, *Mbp* und *Plp* bei C57BL/6 Oligodendrozyten im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Myelingenexpression festgestellt.

Eine 5 mM ASS-Behandlung führte nach 48 Stunden zu einer signifikant geringeren *Mag*-, *Mbp*- und *Plp*-Genexpression im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe (*Mag*: $p < 0.01$, *Mbp*: $p < 0.001$, *Plp*: $p < 0.01$) (s. Abb. 3.8).

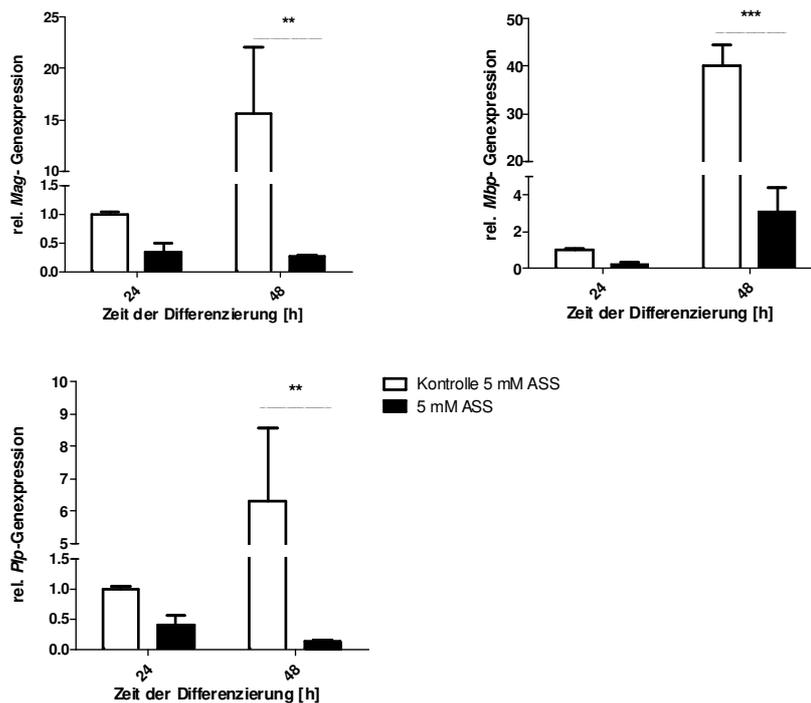


Abb. 3.8: Der Einfluss einer 48-stündigen 5 mM ASS-Behandlung auf die Myelingenexpression (q-RT-PCRs mit SYBR-Green) von *Mag*, *Mbp* und *Plp* bei C57BL/6 Oligodendrozyten im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Um die Genexpression zu untersuchen, wurden durchgeführt und auf die 24-Stunden-Werte normiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Myelingenexpression festgestellt (*Mag*: $p < 0.01$, *Mbp*: $p < 0.001$, *Plp*: $p < 0.01$).

3.4.3 Darstellung der Differenzierung mittels immunzytochemischer Markierung

Zur Darstellung der Differenzierung unter ASS-Stimulation auf Proteinebene wurden die stimulierten Zellen nach 48 Stunden immunzytochemisch markiert (MBP-Antikörper, PDGFR α -Antikörper und DAPI). Nach 48 Stunden Stimulation zeigte die Stimulationsgruppe 0,5 mM ASS bei der Betrachtung durch das Fluoreszenzmikroskop keinen Unterschied bei der immunzytochemischen Färbung im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Nach 48 Stunden zeigte die Stimulationsgruppe 5 mM ASS eine deutlich geringere Differenzierung; viele Zellen entwickelten sich kaum über den Stand unreifer Oligodendrozyten hinaus.

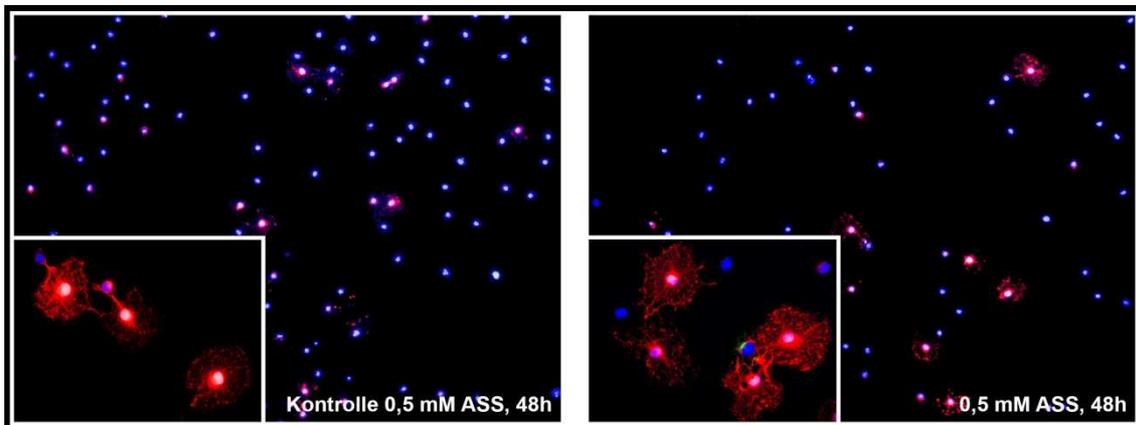


Abb. 3.9: Der Einfluss einer 0,5 mM ASS-Behandlung auf die morphologische Differenzierung von C57BL/6 Oliogodendrozyten im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Zur Darstellung wurden die Zellen nach 48 Stunden immunzytochemisch mit DAPI, MBP-Ak und PDGFR α -Ak markiert und durch das Fluoreszenzmikroskop mit 10- und 40-facher Vergrößerung fotografiert. Kontrollgruppe und Stimulationsgruppen zeigten keinen Unterschied in der Differenzierung.

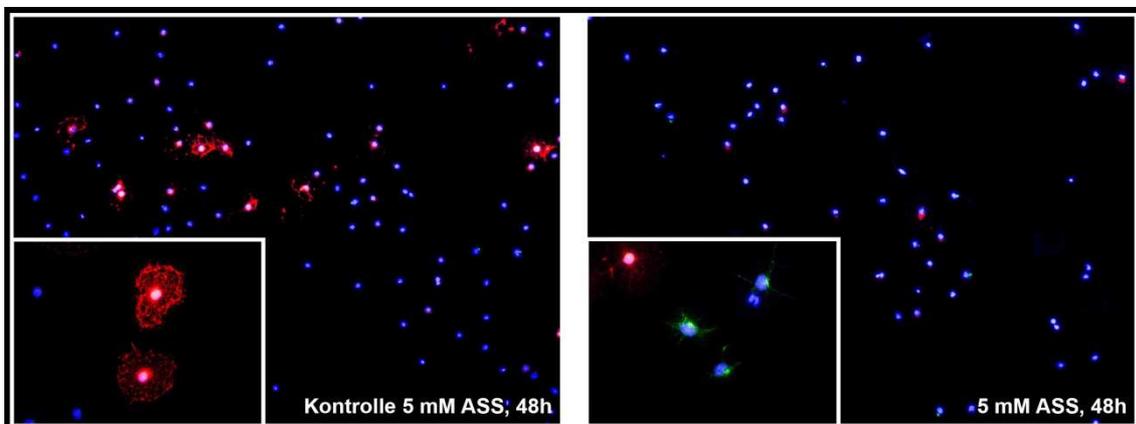


Abb. 3.10: Der Einfluss einer 5 mM ASS-Behandlung auf die morphologische Differenzierung von C57BL/6 Oliogodendrozyten im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Zur Darstellung wurden die Zellen nach 48 Stunden immunzytochemisch mit DAPI, MBP-Ak und PDGFR α -Ak markiert und durch das Fluoreszenzmikroskop mit 10- und 40-facher Vergrößerung fotografiert. Unter 5 mM ASS zeigen die Zellen eine deutlich geringere Differenzierung als die Kontrollgruppe.

4. Diskussion

4.1 Theoretischer Hintergrund

ASS ist ein im klinischen Alltag häufig verwendetes Medikament, das die Blut-Hirn-Schranke überwindet (156). Hauptsächlich wird ASS aufgrund ihrer antiphlogistischen, antiinflammatorischen und thrombozytenaggregationshemmenden Eigenschaften therapeutisch eingesetzt (127). ASS scheint verschiedenste Signalwege zu beeinflussen, weshalb der Einsatz dieses Arzneimittels unter anderem in Gebieten wie der Onkologie diskutiert wird (46,125,126,158). Es bestehen Hinweise darauf, dass auch Signalwege, die in der Zelliniendifferenzierung und Oligodendrozytenreifung von Bedeutung sind, beeinflusst werden (27,102,182).

Bei der Multiplen Sklerose besteht mit zunehmenden Erkrankungsjahren eine fortschreitende Remyelinisierungsschwäche, die mit axonalem Untergang einhergeht. Diese Schwäche wird u.a. auf eine gehemmte Differenzierung der OPCs zurückgeführt (90,202). Aktuelle Studien weisen auf die Möglichkeit einer Remyelinisierungssteigerung hin, z.B. durch eine Aktivierung der oligodendroglialen Differenzierung (27). Dieser Forschungsansatz ist als Therapieoption bei Multipler Sklerose durchaus interessant. ASS besitzt ein gutes Nebenwirkungsprofil und bisher wurden keine negativen Auswirkungen durch den Einsatz von ASS bei MS-Patienten beschrieben (170). Die Verwendung als Therapeutikum im Rahmen der MS-Behandlung wäre somit durchaus denkbar.

4.1.1 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg als therapeutisch relevanter Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg (WBC-Signalweg) ist Gegenstand diverser aktueller Forschungen. Er ist in viele Prozesse involviert, die mehr oder weniger direkt mit der Differenzierung, Zelllinienentwicklung und Zell-Zell-Interaktion verschiedenster Zellarten zusammenhängen (152,161). Für einen Überblick über den kanonischen Signalweg siehe Kapitel 1.4.

Eine Vielzahl von Krankheiten wird auf eine Fehlregulation des Signalwegs zurückgeführt. Dies gilt zum Beispiel für Krebserkrankungen, in deren Rahmen Zell-Zell-Interaktionen eine bedeutende Rolle spielen. Eine Dysregulation des WBC-Signalwegs ist beispielsweise ursächlich für die Familiäre Adenomatöse Poliposis Coli

(FAPC), die eine Prädisposition für kolorektale Karzinome darstellt. Aber auch für spontane Formen des kolorektalen Karzinoms und für Melanome kann eine Fehlregulation des zuvor genannten Signalwegs von Bedeutung sein (86,121,141,159). Weitere Krebserkrankungen, bei denen ein Zusammenhang mit dem WBC-Signalweg diskutiert wird, sind das Medulloblastom (34), das hepatozelluläre Karzinom (163), die chronisch lymphatische Leukämie (104), das Magenkarzinom (190), Formen des Brustkrebses (192), das Ösophaguskarzinom auf dem Boden einer Barrett- Metaplasie (213), das maligne Pleuramesotheliom (9), Formen des Lungenkarzinoms (113), das Blasenkarzinom (193), das Prostatakarzinom (200) und das squamöse Karzinom des Kopf-Hals-Bereichs (154). Bei anderen Erkrankungen, die nicht den Krebserkrankungen zugerechnet werden, gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass eine abnormale Aktivität des Signalwegs ursächlich sein könnte. Neben der MS (55) zählen zu diesen die familiäre Zahnagenesie (94), die Schizophrenie (119) und die Rheumatoide Arthritis (168). Da die Behandlung einiger Krebserkrankungen nach wie vor unzureichend erscheint, ist die Modulation des WBC-Signalwegs als Therapieoption von großem Interesse. Mithilfe zahlreicher Studien *in vitro* und am Mausmodell konnten die Effekte einer Modulation des WBC-Signalwegs aufgezeigt werden: In der Zellkultur konnten Kolonkarzinomzellen durch die Hemmung des WBC-Signalwegs über verschiedene Wege in ihrem Wachstum gestoppt werden und zur Differenzierung gebracht werden (189,194). Als Hemmstoffe des WBC-Signalweges kamen u.a. Retinoide zum Einsatz, deren aktivierte Rezeptoren mit β -Catenin interagieren können. Die Formation des β -Catenin-Tcf-Komplexes wurde verringert und die Zielgen-Expression herunterreguliert. Die beobachtete Reduktion des Kolonkarzinomzellwachstum könnte auf diesen Effekt zurückzuführen sein (48,169). Auch eine Vitamin D-Gabe verringerte die Tumormasse im APC defizienten Mausmodell und in der Kolonkarzinomzelllinie LoVo über eine Modulation des WBC-Signalwegs (4,70). Neuere Entwicklungen sind monoklonale Antikörper, die sich z.B. direkt gegen Wnt1 und Wnt2 richten. Die Antikörper induzierten bei verschiedenen Karzinomzelllinien *in vitro* Apoptose (72,154,210). Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung des WBC-Signalwegs wurde über artifiziell produzierte hemmende Moleküle *in vitro* beobachtet. Der Ansatzpunkt der hemmenden Moleküle ist unterschiedlich, der Einfluss kann beispielsweise über die Zerstörung des β -Catenin/Tcf-Komplexes

erfolgen (189,194). Dieser ist für die in Karzinomzellen häufig gesteigerte Zielgenexpression des WBC-Signalweges essentiell. Auch durch onkolytische Viren konnte experimentell eine Zerstörung der Karzinomzellen, die einen aktivierten WBC aufwiesen, erreicht werden (28,103). Die Zielgene des WBC-Signalwegs wurden experimentell ebenfalls als Angriffspunkt genutzt. Mithilfe von *antisense*-Molekülen, die eine gegenläufige Basenabfolge zur Ziel-mRNA aufweisen, konnte durch die Reduktion von CyclinD1 *in vitro* eine Wachstumshemmung einer Kolonkarzinomzelllinie beobachtet werden (197).

Medikamente, die neben anderen bereits seit längerem bekannten Wirkungen auch den WBC-Signalweg beeinflussen, sind nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR). Dazu gehört unter anderem die Acetylsalicylsäure (ASS) (14,40,195). Die verminderte Inzidenz von kolorektalen Karzinomen bei regelmäßiger Einnahme von ASS wurde bereits in mehreren humanen Studien nachgewiesen (21,46). Für weiterführende Informationen siehe Kapitel 4.1.3 und 4.1.4.

4.1.2 Die Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der oligodendroglialen Differenzierung und der Multiplen Sklerose

Im Rahmen der Oligodendrozytenentwicklung scheint der WBC-Signalweg bereits sehr früh eine Rolle zu spielen. Schon die neuralen Stammzellen sprechen im Mausmodell auf eine Aktivierung des WBC-Signalwegs mit einer Steigerung der Oligogenese an (133). Auch die Differenzierung der Stammzellen in Neuronen oder Gliazellen kann über diesen Signalweg reguliert werden (25,35).

Zur Feinregulation stellten Tawk et al. Versuchsreihen vor: Die Myelinisierung, und zwar abhängig vom Entwicklungsstadium der Oligodendrozyten oder der Vorläuferzellen, verläuft über den WBC-Signalweg. Sowohl *in vitro* (Maus), als auch im Zebrafischmodell wurde ein Ansprechen der Oligodendrozyten im Sinne einer vermehrten Myelinenexpression durch eine Aktivierung des WBC-Signalwegs beobachtet. Die Expression der Myelogene *Mbp* und *Plp* war auf einen aktiven WBC-Signalweg angewiesen, dieser wurde jedoch nur über distinkte Zeiträume der Embryonalzeit benötigt. Die durch *Mbp* und *Plp* kodierten Myelinproteine MBP und PLP sind essentiell für eine funktionell einwandfreie Myelinisierung. Die Bildung der mRNA von TCF7L2, einem Zielgen des WBC-Signalwegs, erreichte in der frühen Entwicklung von Mäusen ein hohes Level (188). Auch Fu et al. zeigten, dass während

der Myelinisierung der WBC-Signalweg nur zu gewissen Zeitpunkten und in bestimmten Bereichen aktiv ist: TCF7L2-mRNA konnte zu Beginn der Embryonalzeit (E 11,5 bis E 15,5) ausschließlich in der ventrikulären Zone detektiert werden und zu späteren Zeitpunkten (ab E 18,5) im Parenchym des Rückenmarkes. Im Rückenmark der adulten Maus konnte keine TCF7L2-mRNA gefunden werden (58).

Die Remyelinisierung, wie sie beispielsweise nach oligodendroglialem Zelltod in der Multiplen Sklerose auftritt, scheint zu Teilen ebenfalls an den WBC-Signalweg gekoppelt zu sein. Im Cuprizon-Modell (Mausmodell der Multiplen Sklerose durch toxininduzierte Demyelinisierung) war TCF7L2, ein Transkriptionsfaktor von β -Catenin, in der Remyelinisierungsphase besonders stark exprimiert. Dies ist auch zu beobachten bei Patienten mit demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS (hier Progressive Multifokale Leukenzephalopathie) während der Remyelinisierung nach oligodendroglialen Schäden. Die erhöhten TCF7L2-Level wurden allerdings ausschließlich bei Vorläuferzellen beobachtet, die sich nicht in der Teilung befanden (58). Auffällig ist also, dass während der Myelinisierung und Remyelinisierung der WBC-Signalweg nur zu gewissen Zeitpunkten und in bestimmten Bereichen aktiv ist. Die Regulation dieses Signalwegs scheint also sehr stark zeitlich und räumlich organisiert zu sein.

Obwohl, wie beschrieben, die Aktivität des WBC-Signalwegs für einen regulären Myelinaufbau nicht fehlen darf, deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass ein überaktiver Signalweg an der Pathogenese der Multiplen Sklerose beteiligt ist. Die Überaktivierung könnte zu einer Differenzierungshemmung führen, die in späten Stadien der MS eine Remyelinisierung deutlich inhibiert (22,53,64,90,172).

Es wurde gezeigt, dass die Expression einiger Myelogene *in vitro* und *in vivo* durch eine künstliche Überaktivierung des WBC-Signalwegs reduziert werden kann (53,56). Dies entspricht einer Hemmung der Differenzierung von OPCs zu Oligodendrozyten. Negativregulatoren des Signalwegs wie Axin2, SFRP1 oder Sox17 (Sox17 übt seinen Einfluss auf den WBC vermutlich über eine Verringerung der zellulären β -Catenin-Level aus), konnten durch vermehrte Aktivität eine Steigerung der Reifung von Oligodendrozyten und höhere Myelinproteinlevel bewirken (26,30,55). Das durch die Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli bekannte APC-Protein, ein Tumor-Suppressor, wurde als essentiell für die Differenzierung von OPCs eingestuft. Er ist im WBC-Signalweg am Abbau von β -Catenin beteiligt und wirkt somit hemmend auf den

Signalweg (97). Preisner et al. fanden heraus, dass ICG 001, ein *small molecule*, das aufgrund seiner Fähigkeit den WBC zu hemmen, zu einer gesteigerten Differenzierung der Oligodendrozyten führt (Preisner et al. Acta Neuropathologica; in press).

Zusammenfassend existiert also sowohl Literatur, laut der ein aktiver WBC-Signalweg eine Myelinisierung und Remyelinisierung positiv beeinflusst, als auch Literatur, die einen überaktiven Signalweg für die Remyelinisierungsschwäche in der MS verantwortlich macht. Diese - sich auf den ersten Blick widersprechenden - Studienergebnisse schließen einander jedoch nicht aus. Vielmehr deuten die bisherigen Studien darauf hin, dass der WBC-Signalweg je nach Zeitpunkt, Ort, Zelltyp und Aktivierungsgrad unterschiedliche und teilweise sogar gegensätzliche Einflüsse nehmen kann. Der Unterschied zwischen einer physiologischen Aktivierung und einer pathologischen Überaktivierung im Sinne einer Fehlregulation ist enorm. Die Nuancen der physiologischen Regelkreisläufe werden möglicherweise in pathologischen Situationen der Aktivierung nicht wiedergegeben. Da die Regulation des Signalwegs sehr komplex und empfindlich zu sein scheint, ist der Einfluss einer künstlichen Aktivierung oder Hemmung und damit ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt eventuell zeitlich und zellulär nur schwer auszumachen und konnte bisher in klinischen Studien nicht belegt werden. Die Identifizierung von Substanzen, die *in vitro* und in demyelinisierenden Tiermodellen die oligodendrogliale Differenzierung und Remyelinisierung fördern, stellt somit einen ersten Schritt dar, um herauszufinden, ob eine Inhibition des WBC-Signalwegs eine therapeutische Option bei der MS darstellt. Dabei ist zu bedenken, dass viele Substanzen multiple Signalkaskaden modulieren und somit Studienergebnisse beeinflussen können.

4.1.3 Durch ASS beeinflusste Signalwege und ihre Einsatzmöglichkeiten

Der Cyclooxygenase-Pathway ist der bekannteste Signalweg, den ASS beeinflusst. Über ihn werden zahlreiche Effekte gesteuert, die schon früh der Wirkung der ASS zugeschrieben wurden. Die Acetylsalicylsäure ist ein irreversibler Hemmer der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX1 und 2) (60,177). In niedriger Dosierung (75 mg pro Tag) wird vor allem die COX1 gehemmt, was über eine verminderte Produktion von Thromboxan A2 aus Arachidonsäure eine Thrombozytenaggregationshemmung zur Folge hat (32,136). Dieser Effekt wird therapeutisch bei Hochrisikopatienten zur

Primärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen genutzt (74). Auch zur Sekundär- und Tertiärprophylaxe wird ASS bei Patienten mit verschiedenen Herz-Kreislaufkrankungen eingesetzt (65,162). Die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung wird außerdem bei der Polycythaemia Vera genutzt, im Rahmen derer ASS den Status eines Orphan-Medikaments hat (52,95). In höherer Dosierung (> 325 mg pro Tag) kommt ASS als Analgetikum und aufgrund der antiinflammatorischen Eigenschaften als Immunmodulator zum Einsatz (176). Die COX2, die durch eine hohe ASS-Dosierung irreversibel gehemmt wird, vermittelt die Bildung von Prostaglandinen (u.a. D, E, F und G), die vor allem Schmerzen und Entzündungsprozesse modulieren (51,137).

ASS ist außerdem ein Induktor von Subtypen des Leberenzym Cytochrom p 450 (36,88). Diese sind hauptsächlich in der Leber lokalisiert und katalysieren den Um- und Abbau verschiedener Medikamente. Durch eine Enzyminduktion werden diverse Medikamente schneller abgebaut, was bei deren Dosierung zu berücksichtigen ist. Cytochrome vermitteln auch den Umbau körpereigener Produkte, so z.B. den Abbau der Arachidonsäure. Als Endprodukt des Abbaus entsteht ein endogenes Antipyretikum, welches effektiver als ASS selbst die COX2 hemmt (88).

Durch ASS wird zudem die mRNA-Expression des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors gamma (PPAR γ) gesteigert. Dieser weist anti-entzündliche Eigenschaften auf und ist in den Zellstoffwechsel involviert (181,209). Interessanterweise konnte im EAE-Modell (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis, ein Tiermodell der MS) durch eine gesteigerte PPAR γ -Aktivität eine Reduktion der klinischen Symptome beobachtet werden (124).

Gegen den Nutzen von ASS muss jedoch immer das erhöhte Blutungsrisiko abgewogen werden. Außerdem bewirkt ASS über eine Hemmung von COX1 eine verminderte Bildung der zytoschutz wirkenden Prostaglandine I₂ und E₂. Schleimhautulcerationen im Gastrointestinaltrakt können die Folge sein (71).

Seit einiger Zeit wird ein protektiver Effekt von ASS im Rahmen einiger Karzinomarten diskutiert (46,63). Durch eine Langzeiteinnahme von 75 mg ASS täglich über mehr als fünf Jahre wurde eine signifikante Verringerung der Inzidenz von kolorektalen Karzinomen, Ösophaguskarzinomen und Lungenkarzinomen beobachtet (158). Diese Wirkung wird unter anderem der Hemmung der COX2 und COX1 zugeschrieben. Die COX2 ist in 43% der humanen Dickdarmadenome und in 86% der

Kolonkarzinome überexprimiert, ebenso in vielen weiteren Krebsarten (49,57,201). Die gesteigerte COX2-Aktivität geht mit einer erhöhten Prostaglandinkonzentration einher, die für Angiogenese und Tumorwachstum verantwortlich gemacht wird. Die Unterdrückung von COX2 führte bei APC defizienten Mäusen zu signifikant weniger Adenomen (135).

Weitere Signalwege, die durch ASS beeinflusst werden können, sind der Rho-Signalweg und der p21Ras / MAPK-abhängige Signalweg. Beide Signalwege werden als bedeutend für die Oligodendrogenese bezeichnet und konnten durch ASS moduliert werden. Ersterer scheint wichtig für die Proliferation und Differenzierung von diversen Zelllinien zu sein, zweiterer scheint Einfluss auf Proliferation und Apoptose verschiedener Zellarten zu haben (27,182).

Ein weiterer Effektorweg der NSAR scheint der im Folgenden beschriebene WBC-Signalweg zu sein.

4.1.4 Einfluss von ASS und anderen NSAR auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Mehrere Studien haben Anhalte geliefert, dass der WBC-Signalweg durch Acetylsalicylsäure und anderen nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) an verschiedenen Stellen meist im Sinne einer Hemmung beeinflusst wird:

In der Kolonkarzinomzelllinie SW480 führte ASS über die Proteinphosphatase 2A (PP2A), einen Bestandteil des Abbaukomplexes, zu einer vermehrten Phosphorylierung von β -Catenin, was seinen Abbau zur Folge hatte (14).

In weiteren Studien ersetzten NSAR im APC-Modell die fehlende Funktion des APC und hemmten die Expression von PPAR δ , welches normalerweise ein Zielgen des WBC-Signalwegs ist (23,73).

Nath et al. demonstrierten außerdem, dass NO-ASS in der Lage ist, die Bindung von β -Catenin an den Transkriptionsfaktor TCF7L2 im Zellkern zu lösen. ASS scheint somit den Signalweg auch im Zellkern beeinflussen zu können (125).

Der Einfluss von Indomethazin und ASS auf vier verschiedene Kolonkarzinomzelllinien (SW948, SW480, HAT LoVo, HTC116) wurde von Dihlmann et al. untersucht. Die Transkription eines Reportergens wurde gehemmt und das Zielgen des WBC-Signalwegs Cyclin D1 war herunterreguliert, dies allerdings ohne β -Catenin oder den β -Catenin/Tcf-Komplex in der Lokalisation oder der Quantität zu

verändern. Hier erfolgte also eine Beeinflussung des Komplexes, ohne die Verbindung zwischen β -Catenin und TCF7L2 zu zerstören (43,44).

ASS kann außerdem die Folgen einer erhöhten Aktivität des WBC-Signalwegs mildern: Über mindestens zwei verschiedene Mechanismen ist der überaktive WBC-Signalweg für einen erhöhten Prostaglandinlevel mitverantwortlich (174,175). ASS unterdrückt die COX1 und 2, senkt die Prostaglandine und mindert damit die Effekte, die ein abnorm funktionierender Signalweg auslöst (s. Abb.4.1).

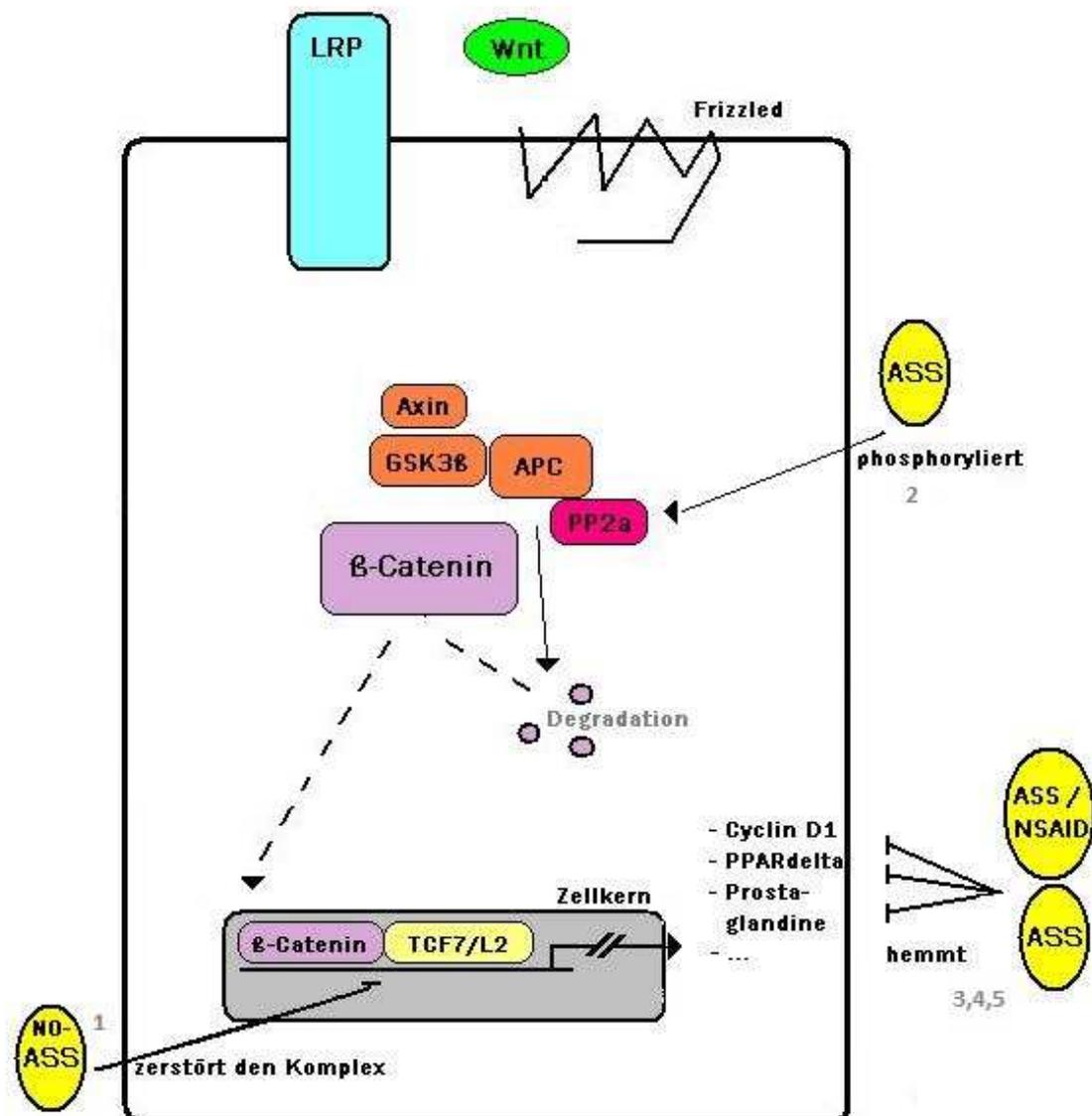


Abb. 4.1: Verschiedene Wirkmechanismen von ASS, NO-ASS und anderen NSAR wie Indomethazin auf den WBC-Signalweg. 1: NO-ASS hemmt den WBC-Signalweg über die Zerstörung der Bindung von β -Catenin und TCF7L2 (125); 2: ASS bewirkt über PP2A die Phosphorylierung und damit den Abbau von β -Catenin (14); 3: ASS und

Indomethazin hemmen die Produktion von Cyclin D1 direkt, ohne den β -Catenin-TCF7L2-Komplex zu beeinflussen (43,44); 4: NSAR „ersetzen“ APC und hemmen die Zielgenproduktion des WBC-Signalwegs (PPAR δ) (23,73); 5: ASS hemmt über COX2 die Auswirkungen eines erhöhten Prostaglandinlevels, der durch einen überaktiven WBC ausgelöst werden kann(174,175). Diese exemplarische Auswahl zeigt, dass ASS und andere NSAR den Signalweg auf unterschiedliche Arten und an verschiedenen Stellen beeinflussen können.

4.1.5 ASS-Dosierung in Versuch und Praxis

Das mögliche Dosierungsspektrum von Acetylsalicylsäure ist in der Praxis sehr breit. Eine thrombozytenaggregationshemmende *low-dose*-Therapie von ca. 75 mg pro Tag (6) steht einer Dosierung von 500 mg bis 1000 mg ASS pro Tag als Kopfschmerztherapeutikum gegenüber (165). In Studien zur Behandlung der MS-assoziierten Fatigue wurden Dosen von 500 mg täglich eingesetzt. Diese zeigten, verglichen mit Placebo, eine subjektive Besserung der Symptome (170). Als sicher toxisch gilt eine Dosis von ca. 150 mg / kg Körpergewicht bei erwachsenen Menschen. In diesem Fall ist eine Azidose mit Bewusstlosigkeit zu erwarten (31). Bei Mäusen wird die mittlere letale Dosis (LD50) mit 250 mg / kg Körpergewicht angegeben (11). Bei der Dosierung in den vorliegenden Versuchsreihen habe ich mich an vorhandener Literatur orientiert (Arbeitsgruppen um Nath und Dihlmann) (43,125,126) und 0,5 mM und 5 mM ASS gewählt. Die Versuche der beiden Arbeitsgruppen wurden an verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt und sollten die Beeinflussung von ASS auf den WBC-Signalweg der Zellen eruieren. In Oligodendrozyten führten diese Konzentrationen zu keinem negativen Effekt auf die Vitalität, daher wurden die Experimente mit diesen Konzentrationen durchgeführt, obwohl sie höher lagen als die maximal tolerierbare Plasmakonzentration.

Andere Arbeitsgruppen variieren in ihren Dosierungen erheblich: Nath et al. verwendeten bei der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW480 Konzentrationen von bis zu 5 mM ASS und NO-ASS, wobei Effekte ab einer Konzentration von 5 mM ASS bzw. 0,1 μ M NO-ASS detektiert werden konnten (125). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden OPCs hingegen mit weitaus geringeren Konzentrationen von ASS behandelt. Unter 0,1 bis 10 μ M zeigten sich positive Effekte im Hinblick auf Proliferation und Differenzierung der OPCs (27).

Die verwendete pulverförmige Acetylsalicylsäure musste für die Versuchsreihen gelöst werden. Da die primären OPCs Ethanol (EtOH) als Lösungsmittel nicht

tolerierten, wurde die Zellvitalität unter NaOH als Lösungsmittel gemessen. NaOH allein verändert jedoch den pH ins Basische, weshalb die NaOH-ASS-Lösung mit HCl auf einen pH von 7,4 auftitriert wurde. Dieses Lösungsmittel hatte bis zu einer Konzentration von 4% keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der OPCs und konnte dementsprechend für weitere Versuche verwendet werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluss von ASS auf die metabolische Aktivität und Proliferation von OPCs

Die metabolische Aktivität der Stimulationsgruppen wurde im MTT-Test nach 48 Stunden Inkubation mit ASS erfasst. Nach Testreihen mit verschiedenen Lösungsmitteln wurde bis zu 4%iges NaOH als Lösungsmittel verwendet. Zur Beurteilung der Proliferation wurde nach 48 Stunden Inkubation ein BrdU-Test durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten in beiden Experimenten keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten Zellen und Kontrollgruppen; somit erscheint ein toxischer Effekt von ASS auf Oligodendrozyten unwahrscheinlich.

Die aktuelle Literatur gibt unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Vitalität und Proliferation verschiedener Zellarten unter einer Hemmung des WBC-Signalwegs an. Es wird jedoch ebenfalls davon ausgegangen, dass die Hemmung des WBC-Signalwegs keine negativen Folgen speziell für die Oligodendrozytenvitalität und -proliferation hat (56). Diverse weitere Arbeitsgruppen zeigten allerdings ein vermindertes Zellwachstum oder sogar eine Induktion der Apoptose bei anderen Zelllinien und -arten durch einen gehemmten WBC-Signalweg, so zum Beispiel bei vielen Karzinomzelllinien unter dem Einfluss von ASS oder anderen NSAR (24,40,149). Es kann generell nicht davon ausgegangen werden, dass zellinterne Signalwege bei unterschiedlichen Zellarten oder Spezies gleich funktionieren, weshalb diese divergierenden Ergebnisse nicht verwunderlich sind. Eine aktuelle Studie, die wie die vorliegende den Einfluss von ASS auf OPCs untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass gering dosiertes ASS einen positiven Effekt auf die Proliferation von OPCs haben kann (27). In diesem Versuch wurden die OPCs aus Rattengehirnen und nicht aus Mäusen isoliert; das Kulturmedium, die Isolationsmethode und das verwendete Lösungsmittel von ASS divergierten ebenfalls von der vorliegenden

Studie. Ein weiterer Unterschied lag in den Dosierungen. Die Arbeitsgruppe verwendete bis zu 10 μM ASS, wohingegen in der vorliegenden Arbeit mit Dosen von 0,5 mM und 5 mM gearbeitet wurde. In der oben genannten Studie konnte unter 0,1 μM ASS die Proliferation der OPCs *in vitro* verbessert werden. Der Nutzen wandte sich unter 10 μM allerdings ins Gegenteil und weniger OPCs proliferierten. Derartig viele Einflussfaktoren erschweren sicherlich den direkten Vergleich. Die divergierenden Ergebnisse zwischen beiden Studien können durch die unterschiedlichen Studienbedingungen durchaus erklärt werden.

Bei der Durchführung der vorliegenden Versuche liegt vermutlich kein systematischer Fehler vor, da die Handhabung der Tests im Labor des Institutes für Neuropathologie des Universitätsklinikums Münster routinemäßig durchgeführt wird. Der MTT-Test nach Mosmann et al. (122) und der BrdU-Test von Roche Applied Science sind anerkannte Methoden zur Überprüfung der Vitalität und Proliferation von Zellen in Kulturen.

4.2.2 Einfluss von ASS auf die Differenzierung von OPCs

Der Einfluss von ASS auf die Differenzierung der OPCs ist zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die zu Beginn erwartete Differenzierungssteigerung unter einer ASS-Behandlung wurde nicht beobachtet, dafür konnte eine Hemmung der Differenzierung unter ASS auf mehreren Ebenen beobachtet werden.

Nach Ausschluss einer Toxizität oder Proliferationshemmung durch ASS (s. Kapitel 4.2.1) wurde die Differenzierung von OPCs unter 0,5 mM und 5 mM ASS auf verschiedenen Ebenen erfasst.

Mit Hilfe von Differenzierungszeitachsen und immunzytochemischer Färbung eines Myelinproteins konnten die morphologischen Veränderungen beobachtet werden. Eine Analyse der Myelingenexpression untersuchte den Einfluss von ASS auf die OPC-Differenzierung auf Genebene.

Die Differenzierung in der Zeitachse

Zur Bestimmung der Entwicklungsstufen der OPCs wurden deren Zellfortsätze in Durchsichtbildern ausgezählt; die Anzahl korreliert mit der Reife der Zellen. Hierzu

wurden die stimulierten Zellen nach 6, 24 und 48 Stunden mit der Mikroskopkamera fotografiert.

Die OPCs zeigten in der Differenzierungszeitachse unter 5 mM ASS nach 48 Stunden signifikant mehr unreife Oligodendrozyten und signifikant weniger reife Oligodendrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die beobachteten Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass 5 mM ASS auf die morphologische Reifung der OPCs einen negativen Einfluss hat. Eine Hemmung des WBC-Signalwegs, wie ASS sie hervorrufen kann, führte allerdings in vielen externen Studien zu einer Differenzierungssteigerung (s.Kapitel 4.1.4).

Die Reifebeurteilung in der Zeitachse, wie sie hier durchgeführt wurde, kann nur als grob abschätzender Parameter eingesetzt werden, da in die Bewertung der subjektive Eindruck des Betrachters einfließt. Die Zellfortsätze wurden auf Ausdrucken manuell ausgezählt. Das Auszählen wurde verblindet durchgeführt, die Ausdrücke konnten also zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht eindeutig einer Stimulationsgruppe zugeordnet werden. Eine Alternative zur manuellen Auszählung ist die computerisierte Analyse der Reife, bei welcher der Durchmesser der differenzierten Zellen inklusive ihrer Fortsätze gemessen wird. Mit dieser Methode wird jedoch die Anzahl der ausgebildeten Zellfortsätze vollständig außer Acht gelassen.

Eine genauere Methode zur Erfassung der morphologischen Differenzierung ist bisher, trotz der bekannten Limitationen der zuvor genannten, nicht beschrieben.

Die morphologischen Stadien der Reifung, die die Oligodendrozyten durchleben, wurden bereits von mehreren Autoren klassifiziert (39,120). Um die Zugehörigkeit der Zellen zu einer Entwicklungsstufe festzulegen, eignet sich allerdings besser die Analyse von Oberflächenmarkern, die sich im Laufe der Differenzierung zuverlässig verändern (69,140,151).

Trotz der angemerken Einschränkungen sind die erhobenen Ergebnisse als Anhaltspunkt durchaus geeignet und korrelieren im Fall dieser Studie mit den Ergebnissen der folgenden Experimente zur Differenzierung.

Der Einfluss von ASS auf die Myelingenexpression und die Myelinproteinsynthese

Zur Evaluation der Genexpressionslevel wurde nach 48-stündiger ASS-Behandlung aus der mRNA cDNA geschrieben und mit Hilfe einer q-RT-PCR und SYBR-Green die

Genexpression der behandelten Zellen bestimmt. Es wurden signifikant reduzierte Expressionslevels der Myelogene *Mag*, *Mbp* und *Plp* unter 5 mM ASS nachgewiesen. In der Immunzytochemie, die mit Hilfe von MBP-Antikörpern, PDGFR α -Antikörpern und DAPI durchgeführt wurde, konnte eine Verminderung des MBP und eine erhöhte Anfärbbarkeit von PDGFR α unter 5 mM ASS nach 48 Stunden nachgewiesen werden. Das MBP ist ein essentielles Protein in der Myelinstruktur (147). Es zeigt, immunzytochemisch markiert, die myelinhaltigen Zellausläufer der Oligodendrozyten an. Die Expression von Myelinen und der Nachweis von Myelinproteinen sind Ausdruck einer Reifung der Zellen. PDGFR α ist ein Antigen, welches Oligodendrozytenvorläuferzellen synthetisieren (166), eine vermehrte Anfärbbarkeit bedeutet in diesem Zusammenhang ein erhöhtes Vorkommen von Zellen, die gering differenziert sind. Die Ergebnisse sind also mit der Annahme einer verminderten Differenzierung vereinbar und zwar auf Genexpressionsebene und Proteinebene.

In der Literatur besteht Konsens darin, dass ASS den WBC-Signalweg moduliert und dieser in der Differenzierung der OPCs eine bedeutende Rolle spielt. Der WBC-Signalweg scheint, je nach Entwicklungsstadium der Zellen, einen ganz unterschiedlichen Einfluss auf die Differenzierung zu haben (s. Kapitel 4.1.2). Ob sich also die isolierten OPCs in meinen Versuchsreihen in einem Zeitfenster und Zustand befanden, in dem sie mit einer Differenzierungssteigerung auf eine Hemmung des Signalwegs reagieren konnten, bleibt unklar.

In Anbetracht der Tatsache, dass alle drei Versuche die gleichen Ergebnisse aufzeigen, kann trotz möglicher Fehler und Verfälschungsmöglichkeiten im Studiendesign davon ausgegangen werden, dass 5 mM ASS eine Differenzierungshemmung bei Maus-OPCs *in vitro* verursacht. Um zu untersuchen, ob ASS auch *in vivo* einen inhibierenden Effekt auf die oligodendrogliale Differenzierung während der Remyelinisierung hat, wären entsprechende tierexperimentelle Untersuchungen notwendig. Interessanterweise konnte bei einer Studie zur MS-bedingten Fatigue kein negativer Effekt von ASS auf die MS-Symptome beobachtet werden; wovon bei einer deutlichen Differenzierungshemmung der OPCs jedoch auszugehen wäre. Allerdings lag der Schwerpunkt des Studiendesigns auf Untersuchungen zum subjektiven Erleben der MS-bedingten Fatigue (170). Signalwege und Zell-Zell-Interaktionen, die in einer isolierten Zellkultur fehlen, könnten für dieses Phänomen ebenso ursächlich sein wie die

Dosierungsunterschiede zwischen der humanen Studie und der vorliegenden *in vitro*-Studie. Auch in der Studie von Chen et al. (27), die ebenfalls den Einfluss von ASS auf OPCs untersuchte, wurde mit deutlich geringeren Dosierungen gearbeitet. Statt 0,5 mM und 5 mM wurden 0,1 μ M bis 10 μ M ASS-Lösungen verwendet. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die Differenzierung der Ratten-OPCs unter 1 μ M bis 10 μ M ASS angeregt wird.

4.3 Kritikpunkte an der vorliegenden Arbeit

4.3.1 Konzeptionelle Kritikpunkte und Ausblick

In der Literatur wurde bisher ein breites Dosierungsspektrum von ASS angewendet; die Entscheidung, 0,5 mM und 5 mM ASS zu verwenden, beruht auf vorhandener Literatur (43,125) und hatte auf die Vitalität von Oligodendrozyten keine Auswirkung. Die aktuelle Studie von Chen et al. (27) präsentiert allerdings unter 0,1 μ M bis 10 μ M ASS im Hinblick auf die Differenzierung von Oligodendrozyten gegensätzliche Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit. Der markanteste Unterschied im Studiendesign beider Studien sind die verschiedenen Dosierungsbereiche. Die Effekte der Dosierungsbereiche von 10 μ M bis 0,5 mM wurden in keiner der Studien untersucht. Interessant wären weitere Versuche unter der Fragestellung, ab welcher Konzentration der positive Effekt von ASS auf die Differenzierung von OPCs gemindert würde bzw. ob eine Differenzierung der OPCs unter modifizierten Versuchsbedingungen (bezüglich Tierart, Isolationsmethode, Kulturmedium, Lösungsmittel) eintreten würde.

Es besteht also die Option, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Versuche mit geringeren Konzentrationen ASS zu wiederholen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Im Institut für Neuropathologie der Universität Münster wurden bereits erste Versuche dazu durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch hier keine Differenzierungssteigerung beobachtet werden kann.

Ein weiterer Kritikpunkt ergibt sich aus der Annahme, dass die beobachteten Effekte auf den WBC-Signalweg zurückzuführen sind. In der vorliegenden Studie wurde nur der direkte Effekt von ASS auf OPCs untersucht, ohne den zugrunde liegenden

Mechanismus darzustellen. ASS ist ein Medikament, das eine Vielzahl von Signalwegen anspricht, wie schon anhand des breiten Anwendungsspektrums zu erkennen ist. Ob die beobachteten Effekte also tatsächlich auf einer Modulation des WBC-Signalweges beruhen, ist unklar und müsste in weiteren Studien untersucht werden. Um den Einfluss von ASS auf den WBC zu bestätigen, würden sich Zielgenexpressionsanalysen des WBC-Signalwegs (z.B. Cyclin D1 oder Axin) oder die Quantifizierung von TCF7L2 und β -Catenin bzw. der Phosphorylierungsstatus von β -Catenin unter den verwendeten Konzentrationen von ASS anbieten. Um die unter ASS beobachtete Differenzierungshemmung in kausalen Zusammenhang zum WBC-Signalweg zu bringen, könnte ein Aktivator zugegeben werden. Nachfolgend würde eine erneute Analyse der Zielgene des WBC-Signalwegs Aufschluss über die Wirksamkeit des Aktivators geben. Eine Beurteilung der Differenzierung der OPCs auf mehreren Ebenen könnte zeigen, ob ein Zusammenhang angenommen werden darf. Alternativ könnte der Effekt von ASS auf Oligodendrozyten mit konstitutiv aktivem und aufgrund fehlender Phosphorylierungsstellen nicht abbaubarem β -Catenin untersucht werden: Übt ASS seinen Effekt über eine Inhibierung oder gesteigerte Degradierung von β -Catenin aus, sollte ASS keinen Effekt auf die oligodendrogliale Differenzierung induzieren.

Bei der Suche nach möglichen Erklärungen der vorgestellten Ergebnisse sollte außerdem an Einflüsse durch weitere Signalwege gedacht werden und beispielsweise gefragt werden, ob andere Signalwege, die eine Differenzierungshemmung verursachen, dominieren und mögliche positive Effekte des WBC-Signalwegs überdecken könnten.

4.3.2 Methodische Kritikpunkte und Ausblick

Der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit bleibt trotz aller Bemühungen um eine möglichst genaue Nachbildung der natürlichen Verhältnisse doch immer eine Nachbildung, die Limitationen aufweist.

Generelle Einschränkungen bei den Testassays sind die Stichprobenart und Stichprobengröße. Hier wurden nur Oligodendrozyten aus dem Großhirn der Maus isoliert. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sich Oligodendrozyten aus anderen anatomischen Lokalisationen anders verhalten. In der immunzytochemischen Färbung wurde außerdem nur ein kleiner Ausschnitt der Population zufällig

ausgewählt, fotografisch festgehalten und bewertet. Ein Rückschluss auf die Gesamtheit der Population ist daher nur eingeschränkt möglich.

Anders als in der Multiplen Sklerose liegt in den vorliegenden Experimenten keine Demyelinisierung von Nervenzellfortsätzen vor; eine Remyelinisierung oder gar die „Remyelinisierungsschwäche“, die im Laufe der MS auftreten kann, wird nicht nachgestellt. Es kann also lediglich zur Differenzierungssteigerung oder -hemmung in Bezug auf die unstimulierten Zellen Stellung genommen werden. Bei der Remyelinisierung wird versucht, durch Demyelinisierung entstandene Schäden zu beheben. Dies ist auch im adulten ZNS möglich. Durch eine Rekrutierung und Differenzierung von Vorläuferzellen werden Axone erneut ummantelt. Hierbei wird allerdings nicht wieder die vorherige Qualität des Myelins erreicht (110). Eine Nachempfindung der Demyelinisierung und nachfolgende Beurteilung der Remyelinisierung wäre beispielsweise in einem Mausmodell möglich. Hier kämen toxininduzierte, virusinduzierte oder autoimmuninduzierte Demyelinisierungsmodelle in Frage, beispielsweise das Cuprizonmodell, bei dem durch Noxen ein Oligodendrozytenschaden verursacht wird (109), das EAE-Modell (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) (98), in dem eine Autoimmunreaktion die Demyelinisierung auslöst oder das Modell des Theilers muriner Encephalomyelitisvirus (TMEV) (157), bei dem eine virusinduzierte Demyelinisierung auftritt.

Außerdem stellt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen, wie in jedem *in vitro* Versuch mit spezieisfremden Zellen, auch hier ein Problem dar:

Zum einen bedeutet eine *in vitro*-Situation immer das Fehlen von bekannten und unbekanntem Faktoren sowie das Hinzufügen von Faktoren, die *in vivo* so nicht zusammengekommen wären. Hier soll als Beispiel der Kontakt zu Neuronen herausgehoben werden. In einer Kokultur mit Neuronen wird die Myelingenexpression von *Mag*, *Mbp* und *Plp* deutlich gesteigert (111,112), auch *in vivo* wurde eine Steigerung der Myelingenexpression durch den Kontakt mit Neuronen beobachtet (84). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass ein bedeutender natürlicher Anreiz zur Differenzierung in einer Monokultur nicht gegeben ist.

Zum anderen ist die Übertragung der Ergebnisse von Nager auf Mensch schon aufgrund der deutlich divergierenden Myelinisierungsgeschwindigkeit des ZNS mit Vorbehalt zu betrachten. Die Myelinisierung ist ein komplexer Prozess, der bis heute

nicht gänzlich verstanden ist. Die Signalwege, die diesen präzisen Prozess steuern, sind Thema diverser Studien. Die Schritte der Migration, Adhäsion und schließlich Ummantelung sind jedoch bekannt. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Wirbeltierspezies im Hinblick auf die Oligodendrozytenentwicklung, -anzahl und -verteilung sind beträchtlich. Ein Oligodendrozyt kann beispielsweise je nach Spezies einen bis vierzig myelinisierende Zellausläufer besitzen (17,139). Bei der Maus beginnt die Myelinisierung bei der Geburt im Rückenmark. Die Myelinisierung des *Nervus Opticus* ist bei Mäusen z.B. mit ca. 30 Tagen abgeschlossen und die komplette Myelinisierung ist mit ca. 60 Tagen beendet(12). Obwohl beim Menschen ein großer Teil der Myelinisierung in früher Kindheit stattfindet, kann sie in Teilen des Gehirns bis in die zweite Lebensdekade andauern (77,148,205).

Die erarbeiteten Daten sollten also in Relation zueinander betrachtet werden. Für eine realistischere Nachbildung der Situation, würden sich zerebrale Schnittkulturen und *in vivo*-Experimente anbieten.

Hinzu kommt, dass die Acetylsalicylsäure auf Maus und Mensch unterschiedliche pharmakologische Auswirkungen zeigt. ASS hat beispielsweise bei trächtigen Nagern teratogene Wirkungen auf die Nachkommen (13), wird aber in der humanen Schwangerschaft besonders im ersten Trimenon als Schmerzmittel zweiter Wahl ohne teratogene Folgen eingesetzt und kann während der gesamten Schwangerschaft als *low-dose*-Therapie eingesetzt werden (1). Dieses Beispiel soll die eingeschränkte Übertragbarkeit von pharmakologischen Wirkungen von ASS auf Nager und Mensch verdeutlichen. Der humanen klinischen Phase einer Studie müssen jedoch ohne Frage *in vitro*-Experimente und *in vivo*-Tierexperimente vorangehen. Obwohl bereits humane OPCs aus Biopsien isoliert werden konnten, kann dies nicht den Bedarf an OPCs zu Forschungszwecken decken (115). Der Mangel an primären humanen Oligodendrozyten könnte durch die Generierung von Oligodendrozyten aus humanen IPS-Zellen behoben werden (81,155,185,186). Inwiefern sich diese Methoden für solche Fragestellungen durchsetzen können, bleibt abzuwarten.

Obwohl ASS ein Medikament ist, das in der Therapie der MS schon Einsatz fand und positive Resultate erzielte (170), ist die Wirkungsweise von ASS und die Einsatzmöglichkeit in diesem Zusammenhang noch nicht endgültig geklärt. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse sprechen für einen negativen

Effekt von ASS in hohen Konzentrationen auf die oligodendrogliale Differenzierung; somit erscheinen hohe Konzentrationen nicht geeignet die Remyelinisierung zu fördern. Allerdings kann durch das neu hinzugewonnene Verständnis ein Beitrag geleistet werden die Multiple Sklerose ein Stück weiter zu verstehen und den Weg für mögliche andere Therapieoptionen zu ebneten.

Literaturverzeichnis

(1) Pharmakovigilanz- und Beratungszentrum für Embryonaltoxikologie, Charité Universitätsklinikum Berlin (11.08.2014) Pharmakovigilanz- und Beratungszentrum für Embryonaltoxikologie, Informationen zu Medikamenten Acetylsalicylsäure. Online im Internet: URL: <https://www.embryotox.de/aspirin.html> [Abrufdatum: 17.09.2014]

(2) Adams CW, Poston RN, Buk SJ (1989) Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *J.Neurol.Sci.* 92 (2-3): 291-306

(3) Ahlgren C, Odén A, Lycke J (2012) A nationwide survey of the prevalence of multiple sclerosis in immigrant populations of Sweden. *Mult.Scler.* 18(8):1099-107

(4) Akhter J, Chen X, Bowrey P, Bolton EJ, Morris DL (1997) Vitamin D3 analog, EB1089, inhibits growth of subcutaneous xenografts of the human colon cancer cell line, LoVo, in a nude mouse model. *Dis.Colon Rectum* 40 (3): 317-321

(5) Albright AV, Lavi E, Black JB, Goldberg S, O'Connor MJ, Gonzalez-Scarano F (1998) The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *J.Neurovirol.* 4 (5): 486-494

(6) Antithrombotic Trialists' Collaboration (2002) Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324 (7329): 71-86

(7) Aubin N, Curet O, Deffois A, Carter C (1998) Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J.Neurochem.* 71 (4): 1635-1642

(8) Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann.Neurol.* 55 (4): 458-468

(9) Batra S, Shi Y, Kuchenbecker KM, He B, Reguart N, Mikami I, et al. (2006) Wnt inhibitory factor-1, a Wnt antagonist, is silenced by promoter hypermethylation in malignant pleural mesothelioma. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 342 (4): 1228-1232

(10) Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382 (6592): 638-642

(11) BEKEMEIER H (1955) Salicylamide and salicylic acid poisoning in cats, in comparison with other animals. I. *Arzneimittelforschung* 5 (10): 572-575

- (12) Bernstein E, Tost M, Holzhausen HJ (1983) Myelinization of the optic nerve in the albino mouse (the Agnes Bluhm Jena-Halle strain). *Klin.Monbl Augenheilkd.* 183 (4): 265-269
- (13) Berry CL, Nickols CD (1979) The effects of aspirin on the development of the mouse third molar. A potential screening system for weak teratogens. *Arch.Toxicol.* 42 (3): 185-190
- (14) Bos CL, Kodach LL, van den Brink GR, Diks SH, van Santen MM, Richel DJ, et al. (2006) Effect of aspirin on the Wnt/beta-catenin pathway is mediated via protein phosphatase 2A. *Oncogene* 25 (49): 6447-6456
- (15) Brandt H, Reichmann [Hrsg] (2010) Multiple Sklerose Klinik, Diagnostik und Therapie. Kohlhammer, Stuttgart, Bd. Klinische Neurologie, 1. Aufl.
- (16) Bronstein JM, Micevych PE, Chen K (1997) Oligodendrocyte-specific protein (OSP) is a major component of CNS myelin. *J.Neurosci.Res.* 50 (5): 713-720
- (17) BUNGE MB, BUNGE RP, RIS H (1961) Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 10: 67-94
- (18) Bunge RP (1968) Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol.Rev.* 48 (1): 197-251
- (19) Casteels-Van Daele M, Van Geet C, Wouters C, Eggermont E (2000) Reye syndrome revisited: a descriptive term covering a group of heterogeneous disorders. *Eur.J.Pediatr.* 159 (9): 641-648
- (20) Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Bussow K, et al. (2005) Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J.Clin.Invest.* 115 (5): 1352-1360
- (21) Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Wu K, Fuchs CS (2008) Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men. *Gastroenterology* 134 (1): 21-28
- (22) Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002) Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 346 (3): 165-173
- (23) Chang WC, Everley LC, Pfeiffer GR, 2nd, Cooper HS, Barusevicius A, Clapper ML (2005) Sulindac sulfone is most effective in modulating beta-catenin-mediated transcription in cells with mutant APC. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1059: 41-55
- (24) Chattopadhyay M, Nath N, Kodela R, Sobocki T, Metkar S, Gan ZY, et al. (2013) Hydrogen sulfide-releasing aspirin inhibits the growth of leukemic Jurkat cells and modulates beta-catenin expression. *Leuk.Res.* 37 (10): 1302-1308
-

- (25) Chen BY, Wang X, Wang ZY, Wang YZ, Chen LW, Luo ZJ (2013) Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J.Neurosci.Res.* 91 (1): 30-41
- (26) Chen HL, Chew LJ, Packer RJ, Gallo V (2013) Modulation of the Wnt/beta-catenin pathway in human oligodendrogloma cells by Sox17 regulates proliferation and differentiation. *Cancer Lett.* 335 (2): 361-371
- (27) Chen J, Zuo S, Wang J, Huang J, Zhang X, Liu Y, et al. (2014) Aspirin promotes oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation after white matter lesion. *Front.Aging Neurosci.* 6: 7
- (28) Chen RH, McCormick F (2001) Selective targeting to the hyperactive beta-catenin/T-cell factor pathway in colon cancer cells. *Cancer Res.* 61 (11): 4445-4449
- (29) Chernoff GF (1981) Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency. *J.Hered.* 72 (2): 128
- (30) Chew LJ, Shen W, Ming X, Senatorov VV, Jr, Chen HL, Cheng Y, et al. (2011) SRY-box containing gene 17 regulates the Wnt/beta-catenin signaling pathway in oligodendrocyte progenitor cells. *J.Neurosci.* 31 (39): 13921-13935
- (31) Chyka PA, Erdman AR, Christianson G, Wax PM, Booze LL, Manoguerra AS, et al. (2007) Salicylate poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin.Toxicol.(Phila)* 45 (2): 95-131
- (32) Clarke RJ, Mayo G, Price P, FitzGerald GA (1991) Suppression of thromboxane A2 but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N.Engl.J.Med.* 325 (16): 1137-1141
- (33) Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000) Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 343 (20): 1430-1438
- (34) Dahmen RP, Koch A, Denkhau D, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, et al. (2001) Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res.* 61 (19): 7039-7043
- (35) Dai ZM, Sun S, Wang C, Huang H, Hu X, Zhang Z, et al. (2014) Stage-specific regulation of oligodendrocyte development by Wnt/beta-catenin signaling. *J.Neurosci.* 34 (25): 8467-8473
- (36) Damme B, Darmer D, Pankow D (1996) Induction of hepatic cytochrome P4502E1 in rats by acetylsalicylic acid or sodium salicylate. *Toxicology* 106 (1-3): 99-103

- (37) Dautigny A, Mattei MG, Morello D, Alliel PM, Pham-Dinh D, Amar L, et al. (1986) The structural gene coding for myelin-associated proteolipid protein is mutated in jimpy mice. *Nature* 321 (6073): 867-869
- (38) Dean G (1967) Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br.Med.J.* 2 (5554): 724-730
- (39) Del Rio-Hortega P (1928) Tercera aportacion al conocimiento morfologico e interpretacion funcional de la oligodendroglia. *Mem Real Soc Esp Hist Nat.* (14): 40-122
- (40) Deng L, Hu S, Baydoun AR, Chen J, Chen X, Cong X (2009) Aspirin induces apoptosis in mesenchymal stem cells requiring Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Prolif.* 42 (6): 721-730
- (41) Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2008) Leitlinien der DGN - Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. Online im Internet: URL: http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/LL2008/II08kap_034.pdf [Abrufdatum: 10.02.2012]
- (42) Deutsches Patent und Markenamt (2009) Deutsches Patent- und Markenamt ASS. Online im Internet: URL: <http://register.dpma.de/DPMAREGISTER/marke/register/36433/DE> [Abrufdatum: 31.01.2012]
- (43) Dihlmann S, Siermann A, von Knebel Doeberitz M (2001) The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate beta-catenin/TCF-4 signaling. *Oncogene* 20 (5): 645-653
- (44) Dihlmann S, Klein S, Doeberitz M, von Knebel Doeberitz M (2003) Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol.Cancer.Ther.* 2 (6): 509-516
- (45) Dore-Duffy P, Zurier RB (1979) Lymphocyte adherence in multiple sclerosis: effect of aspirin. *J.Clin.Invest.* 63 (1): 154-157
- (46) DuBois RN, Giardiello FM, Smalley WE (1996) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, eicosanoids, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 25 (4): 773-791
- (47) Duncan ID, Hammang JP, Trapp BD (1987) Abnormal compact myelin in the myelin-deficient rat: absence of proteolipid protein correlates with a defect in the intraperiod line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84 (17): 6287-6291
- (48) Easwaran V, Pishvaian M, Salimuddin, Byers S (1999) Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr.Biol.* 9 (23): 1415-1418

- (49) Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107 (4): 1183-1188
- (50) Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, et al. (2004) Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J.Cell Biol.* 166 (1): 121-131
- (51) Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI (2012) Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 141 (2 Suppl): e89S-119S
- (52) European Commission PUBLIC HEALTH (31.03.2014) Community register of orphan medicinal products. Online im Internet: URL: <http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/o208.htm> [Abrufdatum: 31.03.2014]
- (53) Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, et al. (2009) Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev.* 23 (13): 1571-1585
- (54) Fancy SP, Kotter MR, Harrington EP, Huang JK, Zhao C, Rowitch DH, et al. (2010) Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders. *Exp.Neurol.* 225 (1): 18-23
- (55) Fancy SP, Harrington EP, Yuen TJ, Silbereis JC, Zhao C, Baranzini SE, et al. (2011) Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat.Neurosci.* 14 (8): 1009-1016
- (56) Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw EB,3rd, Grinspan JB (2009) Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation. *Mol.Cell.Neurosci.* 42 (3): 255-265
- (57) Fiebich BL, Mueksch B, Boehringer M, Hull M (2000) Interleukin-1beta induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) synthesis in human neuroblastoma cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB. *J.Neurochem.* 75 (5): 2020-2028
- (58) Fu H, Kesari S, Cai J (2012) Tcf7l2 is tightly controlled during myelin formation. *Cell.Mol.Neurobiol.* 32 (3): 345-352
- (59) Fulton D, Paez PM, Campagnoni AT (2010) The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro* 2 (1): e00027
- (60) Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294 (5548): 1871-1875
-

- (61) Gensert JM, Goldman JE (1997) Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* 19 (1): 197-203
- (62) Giovannoni G (2006) Multiple sclerosis related fatigue. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* 77 (1): 2-3
- (63) Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC (1994) Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann.Intern.Med.* 121 (4): 241-246
- (64) Goldschmidt T, Antel J, Konig FB, Bruck W, Kuhlmann T (2009) Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72 (22): 1914-1921
- (65) Guo Y, Lip GY, Apostolakis S (2013) The challenge of antiplatelet therapy in patients with atrial fibrillation and heart failure. *J.Cardiovasc.Transl.Res.* 6 (3): 388-397
- (66) Haahr S, Sommerlund M, Moller-Larsen A, Mogensen S, Andersen HM (1992) Is multiple sclerosis caused by a dual infection with retrovirus and Epstein-Barr virus? *Neuroepidemiology* 11 (4-6): 299-303
- (67) Halpin TJ, Holtzhauer FJ, Campbell RJ, Hall LJ, Correa-Villasenor A, Lanese R, et al. (1982) Reye's syndrome and medication use. *JAMA* 248 (6): 687-691
- (68) Han MH, Hwang SI, Roy DB, Lundgren DH, Price JV, Ousman SS, et al. (2008) Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 451 (7182): 1076-1081
- (69) Hardy R, Reynolds R (1993) Rat cerebral cortical neurons in primary culture release a mitogen specific for early (GD3+/O4-) oligodendroglial progenitors. *J.Neurosci.Res.* 34 (5): 589-600
- (70) Harris DM, Go VL (2004) Vitamin D and colon carcinogenesis. *J.Nutr.* 134 (12 Suppl): 3463S-3471S
- (71) Hayden M, Pignone M, Phillips C, Mulrow C (2002) Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann.Intern.Med.* 136 (2): 161-172
- (72) He B, You L, Uematsu K, Xu Z, Lee AY, Matsangou M, et al. (2004) A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia* 6 (1): 7-14
- (73) He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99 (3): 335-345

(74) Hebert PR, Hennekens CH (2000) An overview of the 4 randomized trials of aspirin therapy in the primary prevention of vascular disease. *Arch.Intern.Med.* 160 (20): 3123-3127

(75) Heckl RW: (1994) Multiple Sklerose: Klinik, Differentialdiagnose, Behandlung. Georg Thieme, Stuttgart New York, Bd. 1, 1. Aufl.

(76) Hein T, Hopfenmuller W (2000) Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany. *Nervenarzt* 71 (4): 288-294

(77) Hermoye L, Saint-Martin C, Cosnard G, Lee SK, Kim J, Nassogne MC, et al. (2006) Pediatric diffusion tensor imaging: normal database and observation of the white matter maturation in early childhood. *Neuroimage* 29 (2): 493-504

(78) Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J (1994) Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J.Cell Biol.* 124 (5): 729-741

(79) Hsu W, Zeng L, Costantini F (1999) Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J.Biol.Chem.* 274 (6): 3439-3445

(80) International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, et al. (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476 (7359): 214-219

(81) Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (2002) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp.Hematol.* 30 (8): 896-904

(82) Jung M, Sommer I, Schachner M, Nave KA (1996) Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice. *J.Neurosci.* 16 (24): 7920-7929

(83) Kempainen AK, Kaprio J, Palotie A, Saarela J (2011) Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis. *BMJ Open* 1 (1): e000053

(84) Kidd GJ, Hauer PE, Trapp BD (1990) Axons modulate myelin protein messenger RNA levels during central nervous system myelination in vivo. *J.Neurosci.Res.* 26 (4): 409-418

(85) Koch-Henriksen N, Sorensen PS (2010) The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 9 (5): 520-532

(86) Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275 (5307): 1784-1787

- (87) Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, et al. (2000) Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am.J.Pathol.* 157 (1): 267-276
- (88) Kozak W, Kluger MJ, Tesfaigzi J, Kozak A, Mayfield KP, Wachulec M, et al. (2000) Molecular mechanisms of fever and endogenous antipyresis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 917: 121-134
- (89) Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD (1989) The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch.Neurol.* 46 (10): 1121-1123
- (90) 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 (Pt 7): 1749-1758
- (91) Kundu AK (2004) Charcot in medical eponyms. *J.Assoc.Physicians India* 52: 716-718
- (92) Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33 (11): 1444-1452
- (93) Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE, Jr (1985) Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: III. Migration and the risk of MS. *Neurology* 35 (5): 672-678
- (94) Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, et al. (2004) Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am.J.Hum.Genet.* 74 (5): 1043-1050
- (95) Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. (2004) Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N.Engl.J.Med.* 350 (2): 114-124
- (96) Landtblom AM, Fazio P, Fredrikson S, Granieri E (2010) The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Este (1794-1848). *Neurol.Sci.* 31 (1): 29-33
- (97) Lang J, Maeda Y, Bannerman P, Xu J, Horiuchi M, Pleasure D, et al. (2013) Adenomatous polyposis coli regulates oligodendroglial development. *J.Neurosci.* 33 (7): 3113-3130
- (98) Lassmann H, Wisniewski HM (1979) Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: clinicopathological comparison with multiple sclerosis. *Arch.Neurol.* 36 (8): 490-497
- (99) Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol.Med.* 7 (3): 115-121
-

- (100) Laursen RA, Samiullah M, Lees MB (1984) The structure of bovine brain myelin proteolipid and its organization in myelin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81 (9): 2912-2916
- (101) Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S (1999) Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 274 (30): 21464-21470
- (102) Liang X, Draghi NA, Resh MD (2004) Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J.Neurosci.* 24 (32): 7140-7149
- (103) Lipinski KS, Djeha HA, Gawn J, Cliffe S, Maitland NJ, Palmer DH, et al. (2004) Optimization of a synthetic beta-catenin-dependent promoter for tumor-specific cancer gene therapy. *Mol.Ther.* 10 (1): 150-161
- (104) Liu TH, Raval A, Chen SS, Matkovic JJ, Byrd JC, Plass C (2006) CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 66 (2): 653-658
- (105) Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat.Med.* 8 (5): 500-508
- (106) Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 20: 781-810
- (107) Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46 (4): 907-911
- (108) 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 (6): 707-717
- (109) Ludwin SK (1978) Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab.Invest.* 39 (6): 597-612
- (110) Ludwin SK (1997) The pathobiology of the oligodendrocyte. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 56 (2): 111-124
- (111) Macklin WB, Weill CL, Deininger PL (1986) Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in cultured cells. *J.Neurosci.Res.* 16 (1): 203-217
- (112) Matsuda Y, Koito H, Yamamoto H (1997) Induction of myelin-associated glycoprotein expression through neuron-oligodendrocyte contact. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 100 (1): 110-116
-

- (113) Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, et al. (2004) Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res.* 64 (14): 4717-4720
- (114) McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 50 (1): 121-127
- (115) Medina-Rodriguez EM, Arenzana FJ, Bribian A, de Castro F (2013) Protocol to isolate a large amount of functional oligodendrocyte precursor cells from the cerebral cortex of adult mice and humans. *PLoS One* 8 (11): e81620
- (116) Meier H, MacPike AD (1970) A neurological mutation (msd) of the mouse causing a deficiency of myelin synthesis. *Exp.Brain Res.* 10 (5): 512-525
- (117) Metz I, Weigand SD, Popescu BF, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, et al. (2014) Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann.Neurol.* 75 (5): 728-738
- (118) MILLER HG, FOSTER JB, NEWELL DJ, BARWICK DD, BREWIS RA (1963) Multiple Sclerosis: Therapeutic Trials of Chloroquine, Soluble Aspirin, and Gammaglobulin. *Br.Med.J.* 2 (5370): 1436-1439
- (119) Miyaoka T, Seno H, Ishino H (1999) Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr.Res.* 38 (1): 1-6
- (120) Mori S, Leblond CP (1970) Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *J.Comp.Neurol.* 139 (1): 1-28
- (121) Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275 (5307): 1787-1790
- (122) Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* 65 (1-2): 55-63
- (123) Multiple Sclerosis International Federation, 3rd Floor Skyline House 200 Union Street London Multiple Sclerosis International Federation. Online im Internet: URL: http://www.msif.org/en/about_msif/what_we_do/atlas_of_ms/index.html [Abrufdatum: 03.02.2012]
- (124) Natarajan C, Bright JJ (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 production, IL-12 signaling and Th1 differentiation. *Genes Immun.* 3 (2): 59-70

(125) Nath N, Kashfi K, Chen J, Rigas B (2003) Nitric oxide-donating aspirin inhibits beta-catenin/T cell factor (TCF) signaling in SW480 colon cancer cells by disrupting the nuclear beta-catenin-TCF association. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 (22): 12584-12589

(126) Nath N, Vassell R, Chattopadhyay M, Kogan M, Kashfi K (2009) Nitro-aspirin inhibits MCF-7 breast cancer cell growth: effects on COX-2 expression and Wnt/beta-catenin/TCF-4 signaling. *Biochem.Pharmacol.* 78 (10): 1298-1304

(127) National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA (2004) Aspirin compound summary CID: 2244. Online im Internet: URL: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2244> [Abrufdatum: 31.01.2012]

(128) Nguyen T, Mehta NR, Conant K, Kim KJ, Jones M, Calabresi PA, et al. (2009) Axonal protective effects of the myelin-associated glycoprotein. *J.Neurosci.* 29 (3): 630-637

(129) Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P (1988) Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333 (6173): 560-562

(130) Norn S, Permin H, Kruse PR, Kruse E (2009) From willow bark to acetylsalicylic acid. *Dan.Medicinhist Arbog* 37: 79-98

(131) Norton WT (1984) Recent advances in myelin biochemistry. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 436: 5-10

(132) Omlin FX, Webster HD, Palkovits CG, Cohen SR (1982) Immunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *J.Cell Biol.* 95 (1): 242-248

(133) Ortega F, Gascon S, Masserdotti G, Deshpande A, Simon C, Fischer J, et al. (2013) Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat.Cell Biol.* 15 (6): 602-613

(134) Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. (2006) Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol.* 5 (11): 932-936

(135) Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87 (5): 803-809

- (136) Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C (1982) Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J.Clin.Invest.* 69 (6): 1366-1372
- (137) Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G, American College of Chest Physicians (2008) Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 133 (6 Suppl): 199S-233S
- (138) Pedersen L, Jensen MH, Krishna S (2011) Dickkopf1—a new player in modelling the Wnt pathway. *PLoS One* 6 (10): e25550
- (139) Peters A, Josephson K, Vincent SL (1991) Effects of aging on the neuroglial cells and pericytes within area 17 of the rhesus monkey cerebral cortex. *Anat.Rec.* 229 (3): 384-398
- (140) Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R (1993) The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.* 3 (6): 191-197
- (141) Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14 (15): 1837-1851
- (142) Poliak S, Peles E (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat.Rev.Neurosci.* 4 (12): 968-980
- (143) Poltorak M, Sadoul R, Keilhauer G, Landa C, Fahrig T, Schachner M (1987) Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J.Cell Biol.* 105 (4): 1893-1899
- (144) Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann.Neurol.* 13 (3): 227-231
- (145) Poser CM, Brinar VV (2001) Diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Clin.Neurol.Neurosurg.* 103 (1): 1-11
- (146) Prat A, Antel J (2005) Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr.Opin.Neurol.* 18 (3): 225-230
- (147) Privat A, Jacque C, Bourre JM, Dupouey P, Baumann N (1979) Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse "shiverer". *Neurosci.Lett.* 12 (1): 107-112
- (148) Provenzale JM, Liang L, DeLong D, White LE (2007) Diffusion tensor imaging assessment of brain white matter maturation during the first postnatal year. *AJR Am.J.Roentgenol.* 189 (2): 476-486
- (149) Qiu W, Wang X, Leibowitz B, Liu H, Barker N, Okada H, et al. (2010) Chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs eliminates oncogenic

intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107 (46): 20027-20032

(150) Ratcliffe MJ, Itoh K, Sokol SY (2000) A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction. *J.Biol.Chem.* 275 (46): 35680-35683

(151) Rettig WJ, Old LJ (1989) Immunogenetics of human cell surface differentiation. *Annu.Rev.Immunol.* 7: 481-511

(152) Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423 (6938): 409-414

(153) REYE RD, MORGAN G, BARAL J (1963) Encephalopathy and Fatty Degeneration of the Viscera. a Disease Entity in Childhood. *Lancet* 2 (7311): 749-752

(154) Rhee CS, Sen M, Lu D, Wu C, Leoni L, Rubin J, et al. (2002) Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 21 (43): 6598-6605

(155) Rideout WM,3rd, Wakayama T, Wutz A, Eggan K, Jackson-Grusby L, Dausman J, et al. (2000) Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat.Genet.* 24 (2): 109-110

(156) Riedel W, Lang U, Oetjen U, Schlapp U, Shibata M (2003) Inhibition of oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents bacterial-lipopolysaccharide-induced fever. *Mol.Cell.Biochem.* 247 (1-2): 83-94

(157) Rodriguez M, Leibowitz JL, Lampert PW (1983) Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus-induced encephalomyelitis. *Ann.Neurol.* 13 (4): 426-433

(158) Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW (2011) Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 377 (9759): 31-41

(159) Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P (1997) Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275 (5307): 1790-1792

(160) Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, et al. (1993) A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann.Neurol.* 33 (3): 281-285

(161) Salinas PC, Zou Y (2008) Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu.Rev.Neurosci.* 31: 339-358

- (162) Sandercock PA, Counsell C, Tseng MC, Cecconi E (2014) Oral antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst.Rev.* 3: CD000029
- (163) Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. (2000) AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat.Genet.* 24 (3): 245-250
- (164) Schneider A, Montague P, Griffiths I, Fanarraga M, Kennedy P, Brophy P, et al. (1992) Uncoupling of hypomyelination and glial cell death by a mutation in the proteolipid protein gene. *Nature* 358 (6389): 758-761
- (165) Schoenen J (1995) Guidelines for trials of drug treatments in tension-type headache. First edition: International Headache Society Committee on Clinical Trials. *Cephalalgia* 15 (3): 165-179
- (166) Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghoumari AM (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front.Neurosci.* 6: 10
- (167) Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R, Virshup DM (1999) Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 283 (5410): 2089-2091
- (168) Sen M, Chamorro M, Reifert J, Corr M, Carson DA (2001) Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum.* 44 (4): 772-781
- (169) Shah S, Hecht A, Pestell R, Byers SW (2003) Trans-repression of beta-catenin activity by nuclear receptors. *J.Biol.Chem.* 278 (48): 48137-48145
- (170) Shaygannejad V, Janghorbani M, Ashtari F, Zakeri H (2012) Comparison of the effect of aspirin and amantadine for the treatment of fatigue in multiple sclerosis: a randomized, blinded, crossover study. *Neurol.Res.* 34 (9): 854-858
- (171) Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat.Rev.Neurosci.* 6 (9): 683-690
- (172) Shimizu T, Kagawa T, Wada T, Muroyama Y, Takada S, Ikenaka K (2005) Wnt signaling controls the timing of oligodendrocyte development in the spinal cord. *Dev.Biol.* 282 (2): 397-410
- (173) Skegg DC, Corwin PA, Craven RS, Malloch JA, Pollock M (1987) Occurrence of multiple sclerosis in the north and south of New Zealand. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* 50 (2): 134-139
- (174) Smartt HJ, Greenhough A, Ordonez-Moran P, Al-Kharusi M, Collard TJ, Mariadason JM, et al. (2012) beta-catenin negatively regulates expression of the prostaglandin transporter PGT in the normal intestinal epithelium and colorectal

tumour cells: a role in the chemopreventive efficacy of aspirin? *Br.J.Cancer* 107 (9): 1514-1517

(175) Smartt HJ, Greenhough A, Ordonez-Moran P, Talero E, Cherry CA, Wallam CA, et al. (2012) Beta-Catenin Represses Expression of the Tumour Suppressor 15-Prostaglandin Dehydrogenase in the Normal Intestinal Epithelium and Colorectal Tumour Cells. *Gut* 61 (9): 1306-1314

(176) Smyth EM, Burke A, FitzGerald G.A. (2006) Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Publ.Comp, 11. Aufl.

(177) Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA (2009) Prostanoids in health and disease. *J.Lipid Res.* 50 Suppl: S423-8

(178) Soderstrom M, Ya-Ping J, Hillert J, Link H (1998) Optic neuritis: prognosis for multiple sclerosis from MRI, CSF, and HLA findings. *Neurology* 50 (3): 708-714

(179) Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev.Biol.* 83 (2): 311-327

(180) Sprinkle TJ (1989) 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit.Rev.Neurobiol.* 4 (3): 235-301

(181) Staels B, Fruchart JC (2005) Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 54 (8): 2460-2470

(182) Stariha RL, Kikuchi S, Siow YL, Pelech SL, Kim M, Kim SU (1997) Role of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in oligodendroglial process extension. *J.Neurochem.* 68 (3): 945-953

(183) Stratton CW, Sriram S (2003) Association of Chlamydia pneumoniae with central nervous system disease. *Microbes Infect.* 5 (13): 1249-1253

(184) Stutzer P, Kesselring J (2008) Wilhelm Uhthoff: a phenomenon 1853 to 1927. *Int.MS J.* 15 (3): 90-93

(185) Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T (2001) Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr.Biol.* 11 (19): 1553-1558

(186) Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (4): 663-676

(187) Talley CL (2005) The emergence of multiple sclerosis, 1870-1950: a puzzle of historical epidemiology. *Perspect.Biol.Med.* 48 (3): 383-395

- (188) Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, et al. (2011) Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J.Neurosci.* 31 (10): 3729-3742
- (189) Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398 (6726): 422-426
- (190) To KF, Chan MW, Leung WK, Yu J, Tong JH, Lee TL, et al. (2001) Alterations of frizzled (FzE3) and secreted frizzled related protein (hsFRP) expression in gastric cancer. *Life Sci.* 70 (4): 483-489
- (191) Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 338 (5): 278-285
- (192) Ugolini F, Charafe-Jauffret E, Bardou VJ, Geneix J, Adelaide J, Labat-Moleur F, et al. (2001) WNT pathway and mammary carcinogenesis: loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type. *Oncogene* 20 (41): 5810-5817
- (193) Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Tokizane T, Ogishima T, et al. (2006) Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Clin.Cancer Res.* 12 (2): 383-391
- (194) van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111 (2): 241-250
- (195) Wang Y, Chen X, Zhu W, Zhang H, Hu S, Cong X (2006) Growth inhibition of mesenchymal stem cells by aspirin: involvement of the WNT/beta-catenin signal pathway. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 33 (8): 696-701
- (196) Warf BC, Fok-Seang J, Miller RH (1991) Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J.Neurosci.* 11 (8): 2477-2488
- (197) Whittaker SR, Walton MI, Garrett MD, Workman P (2004) The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.* 64 (1): 262-272
- (198) Willer CJ, Dymont DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Canadian Collaborative Study Group (2003) Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 (22): 12877-12882
- (199) Wingerchuk DM, Benarroch EE, O'Brien PC, Keegan BM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH, et al. (2005) A randomized controlled crossover trial of aspirin for fatigue in multiple sclerosis. *Neurology* 64 (7): 1267-1269
-

- (200) Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, et al. (2003) WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J.Pathol.* 201 (2): 204-212
- (201) Wollheim FA (1999) New functions for Cox-2 in health and disease: report of "The Third International Workshop on Cox-2", Ka'upelehu, Kona, Hawaii, USA, 30 August to 2 September 1999. *Arthritis Res.* 1 (1): 45-49
- (202) Wolswijk G (1998) Oligodendrocyte regeneration in the adult rodent CNS and the failure of this process in multiple sclerosis. *Prog.Brain Res.* 117: 233-247
- (203) Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK, et al. (2002) Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 61 (1): 23-32
- (204) Xu X, Koetzner L, Boulet J, Maselli H, Beyenhof J, Grover G (2009) Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study. *Biomed.Chromatogr.* 23 (9): 973-979
- (205) Yakovlev P, Lecours A (1967) The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. In: Minkowski A (Hrsg) *Regional Development of the Brain in Early Life.* Blackwell Science, Oxford, S. 3-70
- (206) Yamamoto Y, Mizuno R, Nishimura T, Ogawa Y, Yoshikawa H, Fujimura H, et al. (1994) Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J.Biol.Chem.* 269 (50): 31725-31730
- (207) Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ, Moon RT (1996) A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr.Biol.* 6 (10): 1302-1306
- (208) Yin X, Baek RC, Kirschner DA, Peterson A, Fujii Y, Nave KA, et al. (2006) Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J.Cell Biol.* 172 (3): 469-478
- (209) Yiqin Y, Meilin X, Jie X, Keping Z (2009) Aspirin inhibits MMP-2 and MMP-9 expression and activity through PPARalpha/gamma and TIMP-1-mediated mechanisms in cultured mouse celiac macrophages. *Inflammation* 32 (4): 233-241
- (210) You L, He B, Xu Z, Uematsu K, Mazieres J, Mikami I, et al. (2004) Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene* 23 (36): 6170-6174
- (211) Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP, Richardson WD (1994) Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* 12 (6): 1353-1362
-

(212) Ziemssen T, Piatkowski J, Haase R (2011) Long-term Effects of Bio-electromagnetic-energyregulation Therapy on Fatigue in Patients With Multiple Sclerosis. *Altern. Ther. Health Med.* 17 (6): 22-28

(213) Zou H, Molina JR, Harrington JJ, Osborn NK, Klatt KK, Romero Y, et al. (2005) Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int.J.Cancer* 116 (4): 584-591

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Pathogeneseformen der Multiplen Sklerose (modifiziert nach Lassmann und Lucchinetti (99)).....	9
Abb. 1.1: Stadien der Oligodendrozytenentwicklung anhand von Morphologie und immunhistochemischen Markern. Modifiziert nach Schumacher et al. (167). Mit freundlicher Genehmigung von Schumacher, Hussain, Gago, Oudinet, Mattern and Ghomari.	12
Abb. 1.2: Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Bei gebundenem Wnt ist der Abbaukomplex gehemmt und β -Catenin kann als Transkriptionsfaktor agieren. Ist Wnt nicht gebunden, kann der Abbaukomplex (u.a. Axin, APC, GSK3 β) β -Catenin degradieren. Modifiziert nach Pedersen et al. (139). Mit freundlicher Genehmigung von Pedersen et al.	15
Abb. 3.1: Der Einfluss einer 24-stündigen 2- und 4%igen Ethanol- und Natriumhydroxid-Behandlung auf die metabolische Aktivität (MTT-Test) von C57BL/6 OPCs im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die mit EtOH behandelten Zellen zeigen eine signifikant geringere metabolische Aktivität (2% EtOH zur Kontrolle $p < 0,001$, 4% EtOH zur Kontrolle $p < 0,001$). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.	49
Abb. 3.2: Der Einfluss einer 48-stündigen 0,5 mM und 5 mM ASS-Behandlung auf die metabolische Aktivität (MTT-Test) von C57BL/6 OPCs im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe mit $n = 3$ Versuchswiederholungen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der metabolischen Aktivität. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.	50
Abb. 3.3: Der Einfluss einer 48-stündigen 0,5 mM ASS-Behandlung auf die Proliferation (BrdU-Test) von C57BL/6 OPCs im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 4$ Versuchswiederholungen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.	52
Abb. 3.5: Der Einfluss einer 6-, 24-, 30- und 48-stündigen 0,5 mM ASS-Behandlung auf die Differenzierung von C57BL/6 OPCs zu Oligodendrozyten im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Um die Differenzierung zu untersuchen, wurden jeweils die Zellfortsätze von 100 Zellen auf Durchsichtbildern ausgezählt und den Zellen Entwicklungsstufen zugeteilt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Differenzierung.	54
Abb. 3.6: Der Einfluss einer einer 6-, 24-, 30- und 48-stündigen 5 mM ASS-Behandlung auf die Differenzierung von C57BL/6 OPCs zu Oligodendrozyten im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Um die Differenzierung zu untersuchen, wurden jeweils die Zellfortsätze von 100 Zellen auf Durchsichtbildern ausgezählt und den Zellen Entwicklungsstufen zugeteilt. Nach 48 Stunden konnten signifikant mehr unreife ($p < 0,05$) und weniger reife Oligodendrozyten ($p < 0,01$) festgestellt werden.	55

-
- Abb. 3.7: Der Einfluss einer 48-stündigen 0,5 mM ASS-Behandlung auf die Myeligenexpression (q-RT-PCRs mit SYBR-Green) von *Mag*, *Mbp* und *Plp* bei C57BL/6 Oligodendrozyten im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Myeligenexpression festgestellt.56
- Abb. 3.8: Der Einfluss einer 48-stündigen 5 mM ASS-Behandlung auf die Myeligenexpression (q-RT-PCRs mit SYBR-Green) von *Mag*, *Mbp* und *Plp* bei C57BL/6 Oligodendrozyten im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Um die Genexpression zu untersuchen, wurden durchgeführt und auf die 24-Stunden-Werte normiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Myeligenexpression festgestellt (*Mag*: $p < 0.01$, *Mbp*: $p < 0.001$, *Plp*: $p < 0.01$).57
- Abb. 3.9: Der Einfluss einer 0,5 mM ASS-Behandlung auf die morphologische Differenzierung von C57BL/6 Oligodendrozyten im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Zur Darstellung wurden die Zellen nach 48 Stunden immunzytochemisch mit DAPI, MBP-Ak und PDGFR α -Ak markiert und durch das Fluoreszenzmikroskop mit 10- und 40-facher Vergrößerung fotografiert. Kontrollgruppe und Stimulationsgruppen zeigten keinen Unterschied in der Differenzierung.58
- Abb. 3.10: Der Einfluss einer 5 mM ASS-Behandlung auf die morphologische Differenzierung von C57BL/6 Oligodendrozyten im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe bei $n = 2$ Versuchswiederholungen. Zur Darstellung wurden die Zellen nach 48 Stunden immunzytochemisch mit DAPI, MBP-Ak und PDGFR α -Ak markiert und durch das Fluoreszenzmikroskop mit 10- und 40-facher Vergrößerung fotografiert. Unter 5 mM ASS zeigen die Zellen eine deutlich geringere Differenzierung als die Kontrollgruppe.58
- Abb. 4.1: Abb. 4.1: Verschiedene Wirkmechanismen von ASS, NO-ASS und anderen NSAR wie Indomethazin auf den WBC-Signalweg. 1: NO-ASS hemmt den WBC-Signalweg über die Zerstörung der Bindung von β -Catenin und TCF7L2 (125); 2: ASS bewirkt über PP2A die Phosphorylierung und damit den Abbau von β -Catenin (14); 3: ASS und Indomethazin hemmen die Produktion von Cyclin D1 direkt, ohne den β -Catenin-TCF7L2-Komplex zu beeinflussen (43,44); 4: NSAR „ersetzen“ APC und hemmen die Zielgenproduktion des WBC-Signalwegs (PPAR δ) (23,73); 5: ASS hemmt über COX2 die Auswirkungen eines erhöhten Prostaglandinlevels, der durch einen überaktiven WBC ausgelöst werden kann (174,175). Diese exemplarische Auswahl zeigt, dass ASS und andere NSAR den Signalweg auf unterschiedliche Arten und an verschiedenen Stellen beeinflussen können.66
-

Lebenslauf

Danksagung

Frau Prof. Dr. Tanja Kuhlmann möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas, die herausragend gute Betreuung und ihre Geduld danken.

Herrn Prof. Dr. Werner Paulus danke ich sehr für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Neuropathologie, Münster durchzuführen.

Bei Anna Preisner, Elke Hoffmann, Karin Hagemeyer, Stefanie Albrecht, und dem restlichen Team der Neuropathologie möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, die vielen Erklärungen und guten Gespräche bedanken. Die Zusammenarbeit mit ihnen hat mir viel Freude bereitet.

Meiner Tante Barbara Lilienbeck und Miguel danke ich ganz herzlich für die Korrektur der Korrektur der Korrektur. Ebenso Lars Brakelmann, der dabei immer noch ein Lächeln auf den Lippen und aufmunternde Worte hatte und Julian Stabentheiner für sein tolles know how mit Fotoprogrammen.

Friederike Belok, Hannah Johannsen, Lena Grunwald, Lydia Nienhaus, Rabea Lichtenberg, Verena Ruhe und Dana Reichenbächer möchte ich für den nötigen Zuspruch zur rechten Zeit danken.

Danke außerdem an meine Freundin Ashley Meloh für die tolle Begleitung, Unterstützung und Ablenkung, vor allem im Endspurt.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Sabine Lilienbeck und Alfons Lück-Lilienbeck, sowie bei meiner Schwester Katharina und meiner Großmutter Elisabeth Lilienbeck bedanken, die mir mit Rat, Tat und Motivation immer zur Seite gestanden haben und mir nicht zuletzt mein Studium überhaupt ermöglicht haben.

Vielen Dank!

Anhang

Genehmigung der tierexperimentellen Arbeit

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Frau
Prof. Dr. med. Tanja Kuhlmann
Institut für Neuropathologie
Universitätsklinikum Münster
Domagkstraße 19
48149 Münster

Tierschutz;

Anzeige nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz (TSchG)

- a) Zuständigkeitsverordnung vom 26. September 1989 (GV NW 1989 S. 508)
- b) Ihre Anzeige vom 20.12.2010, eingegangen am 27.12.2010

Sehr geehrte Frau Prof. Dr. Kuhlmann,

Ihre o. g. Anzeige zu dem Versuchsvorhaben

„Tötung von Mäusen“

wird hiermit bestätigt.

Verantwortliche Versuchsleiterin: Frau Prof. Dr. med. Tanja Kuhlmann

Stellvertretender Versuchsleiter: Herr Dr. med. Volker Senner

Weitere beteiligte Person: Frau M.Sc. Amke Hesse

Art und Zahl der Tiere: 850 Mäuse

Dauer des Versuchsvorhabens: bis zum 31.12.2013

Ort: ZTE der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster

Ändern sich während des Versuchsvorhabens die von Ihnen in Ihrer Anzeige angegebenen Sachverhalte, so sind mir diese unverzüglich anzuzeigen.

Auskunft erteilt:

Herr Salert

Direktwahl 02361/305-3709

Fax 02361/305-3439

poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

8.87-51.05.20.10.262

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 30.12.2010

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 oder 237 bis

Haltestelle "LANUV" und 5 Min.

Fußweg oder mit Buslinie SB 20

bis Haltestelle "Hohenhorster

Weg" und 15 Min. Fußweg in

Richtung Trabrennbahn bis

Leibnizstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED3333

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12

Nach § 8 a Abs. 3 Tierschutzgesetz ist mir am Ende eines jeden Jahres die Zahl der durchgeführten Versuchsvorhaben sowie bei Wirbeltieren Art und Zahl der insgesamt verwendeten Wirbeltiere anzugeben.

Seite 2 / 30.12.2010

Von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr wird abgesehen, da die Tierversuche überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage erhoben werden. Die Klage ist schriftlich vor dem Verwaltungsgericht Münster (Piusallee 38, 48147 Münster) oder zur Niederschrift beim Urkundsbeamten der Geschäftsstelle zu erklären.

Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

Dr. Hieronymus
(Dr. Hieronymus)