

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors CHOP in Mausmodellen der
Multiplen Sklerose.**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Malin Katharina Gottschling
aus
Ebersberg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp
Mitberichterstatter:	PD Dr. Klaus Dornmair Prof. Dr. Frank Weber
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. Tanja Hochstrasser
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	04.07.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	- 5 -
1 Einleitung	- 7 -
1.1 Pathogenese von Multipler Sklerose	- 7 -
1.2 Histopathologie von MS-Läsionen.....	- 7 -
1.3 Endoplasmatisches-Retikulum-Stress	- 8 -
1.4 Therapie-Optionen	- 10 -
1.5 Mausmodelle	- 11 -
1.6 Ziel der Studie	- 13 -
2 Material und Methoden	- 14 -
2.1 Chemikalien und Materialien	- 14 -
2.2 Tierversuche	- 17 -
2.2.1 Versuchsgruppen	- 17 -
2.2.2 Klinische Beurteilung der Mäuse (Scoring)	- 18 -
2.2.3 Transkardiale Perfusion.....	- 18 -
2.3 Histologie und Immunhistochemie	- 19 -
2.3.1 Paraffineinbettung	- 19 -
2.3.2 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung	- 21 -
2.3.3 „Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“ (LFB/PAS) Färbung.....	- 21 -
2.3.4 Immunhistochemie (IHC).....	- 22 -
2.3.5 Immunfluoreszenz (IF)	- 25 -
2.4 Western Blot.....	- 26 -
2.4.1 Vorbereitung der Zellen	- 26 -
2.4.2 Bradford-Assay	- 28 -
2.4.3 SDS-Elektrophorese und Blotting.....	- 30 -
2.4.4 Protein-Nachweis	- 33 -
2.5 Methoden der Auswertung	- 34 -
2.5.1 Auswertung Histologie.....	- 34 -
2.5.2 Auswertung Western Blot	- 38 -
2.5.3 Statistische Auswertung	- 39 -
3 Ergebnisse	- 40 -
3.1 Cuprizone-induzierte Schäden in WT und CHOP ^{-/-} Mäusen	- 40 -
3.2 Anzahl perivaskulärer Läsionen in WT und CHOP ^{-/-} Mäusen.....	- 47 -
3.3 EAE-induzierte Schäden in WT und CHOP ^{-/-} Mäusen	- 50 -
3.4 Vergleich von diffusem und fokalem akutem axonalem Schaden	- 53 -

3.5 Expression von P-eIF2 α in Oligodendrozyten	- 55 -
4 Diskussion	- 57 -
4.1 Diskussion der Methoden	- 57 -
4.1.1 Mausmodelle	- 57 -
4.1.2 Zellkultur	- 58 -
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	- 58 -
4.2.1 CHOP-Deletion wirkt protektiv im Cuprizone-Modell.....	- 58 -
4.2.2 CHOP-Deletion hat keinen Einfluss auf immunologische Schäden	- 60 -
4.2.3 Verminderte Neurodegeneration und Immunzellrekrutierung	- 61 -
4.2.4 ER-Stress in Oligodendrozyten	- 63 -
4.2.5 Abschließende Bemerkung.....	- 63 -
5 Zusammenfassung	- 65 -
Abbildungsverzeichnis	- 66 -
Tabellenverzeichnis.....	- 68 -
Literaturverzeichnis.....	- 70 -
Eidesstattliche Versicherung	- 75 -
Danksagung.....	- 76 -

Abkürzungsverzeichnis

AK:	Antikörper
APP:	„Amyloid Precursor Protein“
Aqua dest.:	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATF4:	„Activating Transcription Factor 4“
ATF6:	„Activating Transcription Factor 6“
BHS:	Blut-Hirn-Schranke
BSA:	Bovines Serumalbumin
CHOP ^{-/-} :	CHOP-Knock-Out (Mäuse)
CHOP:	„CAATT Enhancer binding Protein Homologous Protein“
Cup-EAE:	Cuprizone und Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
DAB:	Diaminobenzidin
EAE:	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2:	„Eukaryotic Translation Initiation Factor 2“
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
HE:	Hämatoxylin-Eosin
HRP:	„Horseradisch“-Peroxidase
HS:	„Horse Serum“
IBA1:	„Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1“
IF:	Immunfluoreszenz
IHC:	Immunhistochemie
IRE1:	„Inositol-Requiring Enzyme 1“
ISR:	„Integrated Stress Response“
LFB/PAS:	„Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“
MOG:	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS:	Multiple Sklerose
MW:	Mittelwert
NGS:	„Normal Goat Serum“
OLIG2:	„Oligodendrocyte Transcription Factor 2“
PBS:	„Phosphate Buffered Saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDL:	Poly-D-Lysin Hydrobromid
PERK:	„Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase“
PLP:	Proteolipid Protein
PVC:	„Perivascular Cuff“ (perivaskuläres Infiltrat)
RT:	Raumtemperatur
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
SEM:	„Standard Error of the Mean“ (Standardfehler)
TBS:	„Tris-Buffered Saline“ (Tris-gepufferte Salzlösung)
UPR:	„Unfolded Protein Response“
WT:	Wildtyp (Mäuse)
ZNS:	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Pathogenese von Multipler Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-inflammatorische, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), deren komplexe und multifaktorielle Pathogenese nicht hinreichend geklärt ist. Lange Zeit wurde eine primär autoimmune Pathogenese angenommen. Diese klassische Hypothese der MS-Pathogenese wird als „Outside-In“-Hypothese bezeichnet. Autoreaktive T-Zellen gelangen von der Peripherie („Outside“) durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und führen zu einer Demyelinisierung und neuronalem Schaden („In“). Die entgegengesetzte „Inside-Out“-Hypothese geht von einem primär neurodegenerativen Mechanismus („Inside“) aus. Die Infiltration peripherer Immunzellen („Out“) erfolgt sekundär [1] (s.Abb.1).

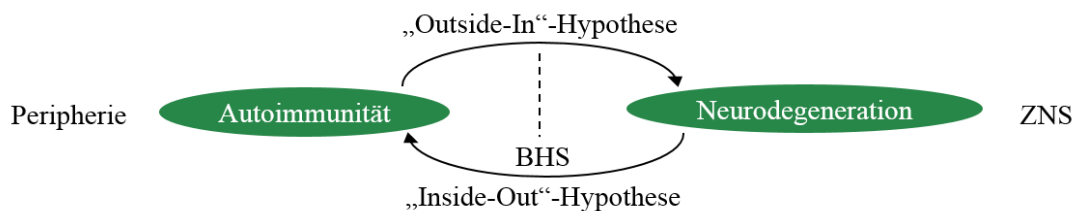


Abbildung 1: Hypothesen der MS-Pathogenese. In Anlehnung an [1]. „Outside-In“-Hypothese: Autoimmune Zellen gelangen über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) aus der Peripherie ins ZNS und führen dort zu Demyelinisierung und neuronalem Schaden. „Inside-Out“-Hypothese: Primäre Neurodegeneration führt sekundär zu einer Aktivierung von Immunzellen.

1.2 Histopathologie von MS-Läsionen

Im Folgenden sind histopathologische Studien aufgeführt, welche die „Inside-Out“-Hypothese unterstützen. Menschliche MS-Läsionen zeigen eine ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich ihrer histopathologischen Eigenschaften. Eine Einteilung nach Lucchinetti et al. unterscheidet zwischen vier Läsions-Typen. Es wurden nicht nur immunzell-dominierte Läsionen, sondern auch Läsionen mit vermehrter Oligodendrozytenapoptose beschrieben [2]. Die Heterogenität der MS-Läsionen ist durch eine rein autoimmune Pathogenese nicht zu erklären. Ebenso sollten primär neurodegenerative Aspekte der MS bedacht werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Entwicklung von akuten Schüben und die Progression der MS auf verschiedenen Pathomechanismen beruhen. Bei Progression der Erkrankung kommt es zu holozephalen Schäden mit globaler Inflammation, Demyelinisierung und diffusem axonalem Schaden. Die diffusen neurodegenerativen Schäden der weißen Substanz treten unabhängig von fokalen inflammatorischen Schäden auf [3, 4].

Einige histopathologische Befunde sprechen für eine initiale Oligodendrozytenapoptose als Ursache der Entstehung neuer Läsionen. In menschlichen MS-Läsionen wurden apoptotische Oligodendrozyten in Abwesenheit peripherer Immunzellen nachgewiesen. Zum Zeitpunkt der initialen Oligodendrozytenapoptose konnten in anderen Zelltypen (Mikroglia-Zellen, Astrozyten, Neuronen) keine Schäden nachgewiesen werden [5]. Ultrastrukturell zeigten sich in frühen MS-Läsionen Defekte der inneren Myelinscheiden bei intakten äußeren Myelinscheiden. Dies spricht gegen eine durch Immunzellen verursachte Demyelinisierung, da diese zunächst die äußeren Myelinscheiden betreffen würde [6]. Diese Ergebnisse unterstützen eine wichtige Studie von Barnett und Prineas, welche in frühen MS-Läsionen eine Degeneration von Oligodendrozyten und eine Aktivierung von Mikroglia-Zellen ohne die Infiltration peripherer Immunzellen nachweisen konnten [7].

1.3 Endoplasmatisches-Retikulum-Stress

In MS-Läsionen wurde eine Aktivierung von Endoplasmatischen-Retikulum-Stress (ER-Stress) Signalkaskaden beschrieben. ER-Stress-Marker wurden in verschiedenen Zellen, mitunter Oligodendrozyten, nachgewiesen [8-10]. ER-Stress entsteht durch die Akkumulation ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine. Als Reaktion auf ER-Stress wird die sogenannte „Unfolded Protein Response“ (UPR), eine Reihe von Signalkaskaden, aktiviert. Durch das Zusammenwirken verschiedener Transkriptions- und Translationsfaktoren soll die Zell-Homöostase wiederhergestellt werden [11, 12] (s.Abb.2). Zu Beginn steht jeweils ein Transmembranprotein, das durch eine luminale Domäne ER-Stress detektiert und in zytosolische Signalkaskaden transformiert.

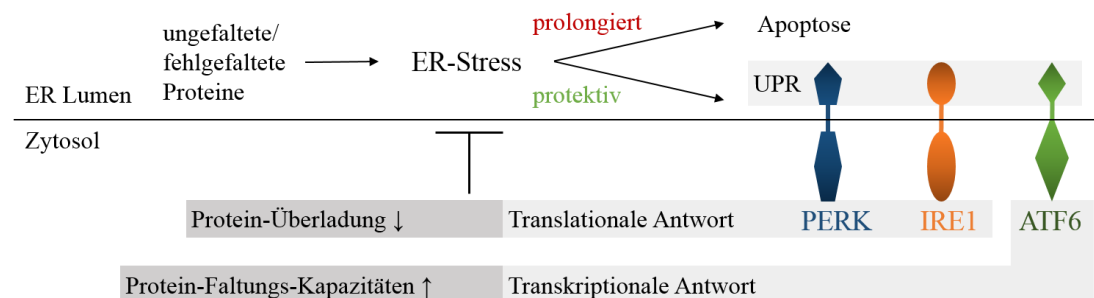


Abbildung 2: Die „Unfolded Protein Response“ (UPR). Durch Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine wird die UPR aktiviert. Die drei initialen Transmembranproteine der UPR sind PERK, IRE1 und ATF6. Durch Regulationen auf transkriptionaler und translationaler Ebene soll durch erhöhte Protein-Faltung und Degradierung ungefalteter Proteine die Zell-Homöostase wiederhergestellt werden. Prolongierter ER-Stress kann zu Apoptose führen.

Die drei initialen UPR-Transmembranproteine sind: „Inositol-Requiring Enzyme 1“ (IRE1) [13], „Activating Transcription Factor 6“ (ATF6) [14] und „Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase“ (PERK) [15]. Im Folgenden wird der PERK-Signalweg näher erläutert (s.Abb.3).

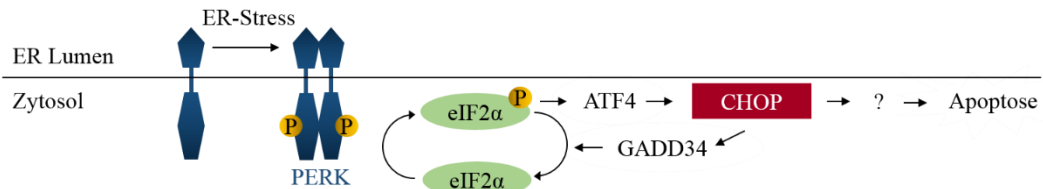


Abbildung 3: PERK-Signalweg. Bei ER-Stress wird PERK via Oligomerisierung und Autophosphorylierung aktiviert. PERK aktiviert eIF2 durch Phosphorylierung an der α -Untereinheit. P-eIF2 α aktiviert unter anderem ATF4, welcher die Expression von CHOP induziert. CHOP aktiviert GADD34, welches im Sinne einer negativen Feedback-Hemmung eIF2 α dephosphoryliert. CHOP spielt eine zentrale Rolle bei ER-Stress-induzierter Apoptose, die genauen Mechanismen sind jedoch unklar.

Ungefaltete Proteine binden an die luminalen Domäne von PERK. Dies führt zu einer Oligomerisierung und Aktivierung der PERK-Proteine via Autophosphorylierung. Aktiviertes PERK bewirkt die Phosphorylierung des „Eukaryotic Translation Initiation Factor 2“ (eIF2) an dessen α -Untereinheit [15, 16]. Da eIF2 α auch unabhängig von ER-Stress durch andere Kinasen phosphoryliert werden kann, wird dieser Signalweg als „Integrated Stress Response“ (ISR) bezeichnet. Es sind neben PERK noch drei weitere eIF2 α -Kinasen bekannt [17-20].

Phosphorylierter eIF2 α (P-eIF2 α) führt zu einer Hemmung der Translation und dadurch zu einer Reduktion der Protein-Beladung. P-eIF2 α führt des Weiteren zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, darunter „Activating Transcription Factor 4“ (ATF4). Die Aktivierung von eIF2 α und ATF4 stellt einen protektiven Signalweg dar [21, 22]. ATF4 induziert die Expression des Transkriptionsfaktors „CAATT Enhancer Binding Protein Homologous Protein“ (CHOP) [23, 24]. CHOP wird als klassischer pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor in Zusammenhang mit ER-Stress gesehen. Die genauen Apoptose-auslösenden Signalkaskaden sind bislang nicht vollständig geklärt [25-29]. CHOP induziert die Expression des Proteins „Growth Arrest and DNA Damage 34“ (GADD34) [27]. GADD34 führt zu einer Dephosphorylierung von eIF2 α und damit einer Feedback-Hemmung des PERK-eIF2 α Signalweges [30].

Zusammenfassend kann der PERK-eIF2 α -CHOP-Signalweg sowohl adaptiv als auch apoptotisch wirken. Es ist unklar, welche Signalmoleküle den Wechsel zwischen Zellüberleben und Zelltod vermitteln.

Die Selektivität der initialen Oligodendrozytenapoptose [5, 7] wirft die Frage auf: Welche Einflüsse schädigen die Oligodendrozyten und warum bleiben andere Zellen davon unbeeinflusst? Oligodendrozyten haben als Myelin-bildende Zellen einen hohen Membranprotein-Metabolismus. Es scheint deshalb plausibel, dass Oligodendrozyten besonders vulnerabel gegenüber ER-Stress sind, da Membranproteine zum Großteil über das ER prozessiert und der Zellmembran zugeleitet werden. In menschlichen MS-Läsionen wurde mitunter eine Expression von CHOP in Oligodendrozyten nachgewiesen [8-10]. Zusammenfassend könnte eine CHOP-induzierte Oligodendrozytenapoptose das initiale Ereignis bei der Entstehung neuer MS-Läsionen sein.

1.4 Therapie-Optionen

Auch einige klinische Beobachtungen unterstützen die „Inside-Out“-Hypothese. Studien zeigten, dass es keinen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der akuten inflammatorischen Schübe und der chronischen Progression der Erkrankung gibt [31-33]. Aktuell zugelassene MS-Therapeutika können durch eine Modulation der Immunantwort die Schub-Frequenz reduzieren. Bisher gibt es jedoch kaum Medikamente, welche die Progression der Erkrankung aufhalten [34, 35]. In einer aktuellen Studie wurde erstmals eine medikamentöse Verzögerung der Krankheitsprogression beschrieben [36].

Eine durch autoimmune Prozesse unbeeinflusste, primäre Neurodegeneration könnte die Ursache für die Progression der Erkrankung und das Versagen der immunmodulatorischen Medikamente sein. In diesem Fall bedarf es der Entwicklung weiterer neuroprotektiver Medikamente, welche eine Läsionsentstehung möglichst früh verhindern. Beispielsweise könnte eine medikamentöse Oligodendrozyten-Protektion die initiale Oligodendrozytenapoptose [5, 7] aufhalten. Um Zielstrukturen für neue Therapie-Ansätze zu identifizieren, ist ein tieferes Verständnis zugrunde liegender Mechanismen und Regulatoren der Oligodendrozytenapoptose essentiell.

1.5 Mausmodelle

Mausmodelle sind ein wichtiger Bestandteil der MS-Forschung. Die in der vorliegenden Studie verwendeten, etablierten Mausmodelle werden im Folgenden vorgestellt.

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches MS-Mausmodell. Eine Intoxikation mit dem Kupfer-Chelator Cuprizone (Bis-Cyclohexanone oxaldihydrazone) führt zu reproduzierbarer, telencephaler Demyelinisierung und Remyelinisierung [37-39]. Histologische Eigenschaften Cuprizone-induzierter Läsionen sind Oligodendrozytenapoptose, Demyelinisierung, Mikrogliose, Astrozytose und akuter axonaler Schaden [38-42]. Das Cuprizone-Modell ist gut geeignet, um die grundlegenden Mechanismen der Oligodendrozytenapoptose zu untersuchen. Die frühen ultrastrukturellen Defekte der inneren Myelinscheiden, welche in MS-Läsionen beschrieben wurden [6], konnten auch im Cuprizone-Modell nachgewiesen werden [43]. Eine häufig untersuchte Region in diesem Modell ist das mediale Corpus callosum (s.Abb.4).

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein immunologisches MS-Mausmodell. Durch subkutane Injektion von Bestandteilen des Myelins, beispielsweise basisches Myelinprotein, Proteolipid-Protein (PLP) oder Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) wird die Bildung von Myelin-spezifischen T-Zellen induziert [44-46]. Histologisch zeigen sich bei der EAE perivaskuläre Leukozyten-Infiltrate und eine sekundäre Demyelinisierung. In diesem Modell werden vorwiegend spinale und cerebelläre Läsionen induziert [47]. Das EAE-Modell spiegelt wichtige Aspekte der „Outside-In“-Hypothese wieder und bildet eine primär auf autoimmunen Prozessen basierende Erkrankung nach (s.Abb.5).

Das von unserer Arbeitsgruppe neu entwickelte Cup-EAE-Modell ist eine Kombination aus dem toxischen Cuprizone-Modell und dem immunologischen EAE-Modell. Cuprizone-induzierte Neurodegeneration wurde als Trigger für periphere Immunzellrekrutierung ins Telencephalon identifiziert [47, 48]. Das Cup-EAE-Modell bildet die „Inside-Out“-Hypothese bestmöglich nach: primäre (Cuprizone-induzierte) Neurodegeneration führt sekundär zu einer Rekrutierung peripherer Immunzellen (s.Abb.6).

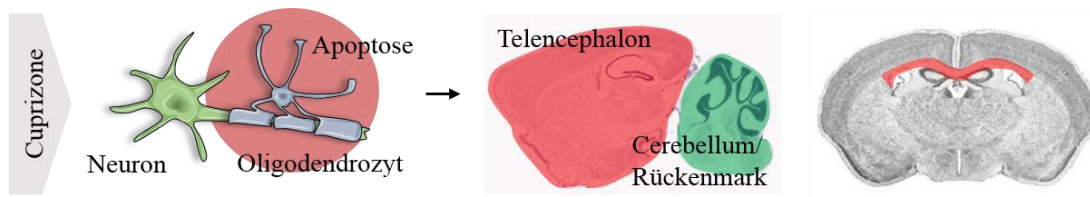


Abbildung 4: *Cuprizone-Modell*. Cuprizone-Intoxikation führt initial zu Oligodendrozytenapoptose. Sagittalschnitt (Mitte): Cuprizone-Intoxikation führt zu diffusem Schaden der weißen Substanz im Telencephalon (rot). Spinale Läsionen werden in der Regel nicht beobachtet (grün). Koronarschnitt (rechts): Eine häufig untersuchte Region ist das Corpus callosum (roter Balken). Quelle der Schnittbilder: [49].

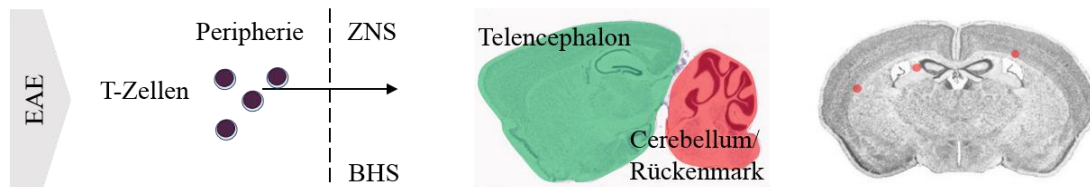


Abbildung 5: *EAE-Modell*. Immunisierung mit Myelin-Bestandteilen induziert die Bildung Myelin-spezifischer T-Zellen. Diese überwinden die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Sagittalschnitt (Mitte): Es kommt vorwiegend zu spinalen Läsionen (rot). Schäden des Telencephalons sind eher selten (grün). Koronarschnitt (rechts): Fokale telencephale Läsionen (rote Punkte) finden sich im EAE-Modell selten. Quelle der Schnittbilder: [49].

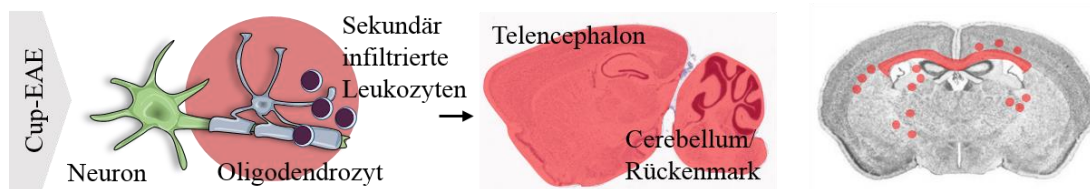


Abbildung 6: *Cup-EAE-Modell*. Cuprizone-induzierte Schäden führen zu einer sekundären Infiltration peripherer Immunzellen. Sagittalschnitt (Mitte): Es sind telencephale und spinale Läsionen nachweisbar (rot). Koronarschnitt (rechts): Neben dem Cuprizone-induzierten Schaden im Corpus callosum (roter Balken) finden sich auch fokale telencephale Läsionen (rote Punkte). Quelle der Schnittbilder: [49].

1.6 Ziel der Studie

Die zentrale Hypothese der vorliegenden Arbeit basiert auf der „Inside-Out“-Hypothese [1]: Ein primär neurodegenerativer Fokus führt sekundär zu einer Rekrutierung peripherer Immunzellen. Ein mögliches initiales neurodegeneratives Ereignis bei der Entstehung von MS-Läsionen ist die ER-Stress-induzierte [8-10] Oligodendrozytenapoptose [5, 7].

In vorigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde CHOP als Regulator der Cuprizone-induzierten Oligodendrozytenapoptose identifiziert. Die homozygote Deletion des CHOP-Gens in CHOP^{-/-} Mäusen [29] führte nach Kurzzeit-Cuprizone-Intoxikation zu einer verminderten Oligodendrozytenapoptose. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der CHOP-Deletion in verschiedenen MS-Mausmodellen untersucht. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Cuprizone-Modell: Führt die durch CHOP-Deletion verminderte initiale Oligodendrozytenapoptose zu einem anhaltenden Schutz vor Cuprizone-induzierten Schäden?
- Cup-EAE-Modell: Führt die verminderte Cuprizone-induzierte Degeneration sekundär zu verminderter peripherer Immunzellrekrutierung?
- EAE-Modell: Beeinflusst die CHOP-Deletion die Immunaktivität?

Die Signalkaskaden der ER-Stress-induzierten Oligodendrozytenapoptose sind unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zusätzlich die Expression von P-eIF2 α in Oligodendrozyten *in vitro* untersucht. Folgende Frage sollte beantwortet werden:

- Oligodendrozyten-Zellkultur: Wird durch ER-Stress eine Phosphorylierung von eIF2 α induziert?

Die Erforschung der Signalwege und Einflussfaktoren initialer Oligodendrozytenapoptose ist für ein tieferes Verständnis der MS-Pathogenese essentiell. Des Weiteren könnten UPR-Signalwege ein möglicher Angriffspunkt für neue MS-Therapeutika sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflussen nicht nur das grundlegende Verständnis der MS-Pathogenese, sondern haben auch eine direkte klinische Relevanz.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Tabelle 1: Chemikalien und Materialien.

Chemikalie/ Material	Hersteller	Bestellnummer
Tierversuche		
Cuprizone	Sigma	C9012
MOG ₃₅₋₅₅ EAE-Induktions-Kit	Hooke Laboratories	EK-2110
Ringer-Lösung	Apotheke, 500ml	PNZ: 01208435
Transkardiale Perfusion		
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck / VWR	106586
Formaldehyd 37%	Roth	P733.2
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	106.345
Natronlauge	Roth	K021.1
Paraffineinbettung		
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka	3.685
Ethanol	Merck	1.00983.
Natronlauge	Roth	4347.1
Paraffin	Merck	107.337
Xylol	VWR	30 28975.325
Färbungen allgemein		
DePeX	Serva	18243.02
Ethanol	Merck	1.00983.
Schlittenmikrotom	Leica	SM2000R
Superfrost Plus Objektträger	VW	631-0108
Xylol	VWR	30 28975.325
HE Färbung		
Aluminiumkaliumsulfat Dodecahydrat	Merck Millipore	101042
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich	15307
Eosin G	Merck	15935
Hämatoxylin	Sigma	H3136-25G
Natriumjodat	Merck	6525
Zitronensäure Monohydrat	Merck	100244
LFB/PAS Färbung		
Essigsäure	Merck	100063
Lithium Carbonat	Merck	105671
Perjodsäure	Merck	100524
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich	3952016
„Luxol-Fast-Blue“ (LFB) MBSN	Roth	7709
Immunhistochemie/ Immunfluoreszenz		
„Gelatin from Cold Water Fish“	Sigma	G7041
ABC-Kit Elite	Vectastain Elite Kit	PK-6100
Bisbenzimid	Sigma	14530
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma	A2153
Diaminobenzidine (DAB)	DAKO	K3468
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem	A3234,9025
FluorPreserve Reagent	Calbiochem	345787-25ML

Natronlauge	Merck	109.137
„Normal Donkey Serum“ (DOS)	Sigma	D9663
„Normal Goat Serum“ (NGS)	Vector	S-1000
PBS Dulbecco-Pulver ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Merck / Biochrom	L 182-50
Salzsäure	Merck	109.057
Tris	Roth	A-1086
Triton X-100	Sigma	T-6878
Tween 20	Sigma	P1379
Wasserstoffperoxid, 30%	Roth	8070.4
Primärantikörper Immunhistochemie/ Immunfluoreszenz		
anti-APP	Millipore	Mab348
anti-GADD153 (=anti-CHOP)	Santa Cruz	sc-575
anti-IBA1	Wako	019-19741
anti-OLIG2	Millipore	MABN50
anti-PLP	Serotec / Biorad	MCA839G
IgG2a Isotyp-Kontrolle	Abcam	ab18415
IgG2b Isotyp-Kontrolle	Abcam	ab18469
Sekundärantikörper Immunhistochemie/ Immunfluoreszenz		
Alexa Fluor 488 „Donkey anti-Rabbit“	Life Technologies	A21206
Alexa Fluor 594 „Donkey anti-Mouse“	Life Technologies	A 21203
Biotinylierter „Goat anti-Mouse“	Vector	BA-9200
Biotinylierter „Goat anti-Rabbit“	Vector	BA-1000
Zellkultur		
3,3,5-Triiodo-L-Thyronin Sodium Salz	Sigma-Aldrich	T6397
Destilliertes Wasser	Braun	88992
„Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline“ (DPBS)	Gibco	14190
„Dulbecco's Modified Eagle Medium“	Gibco	41966
Gentamycin	Life Technologies	15710049
„Horse Serum“ (HS)	Life Technologies	16050122
L-Thyroxin	Sigma-Aldrich	T1775
Muse Cell Analyzer	Merck Millipore	MCH100101
Muse System Check Kit	Merck Millipore	MCH100101
N2-Supplement	Gibco	17502-048
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies	15140122
Poly-D-Lysin hydrobromid (PDL)	Sigma	P6407
Thapsigargin	New England Biolabs	12758 S
TrypLE Express Enzym	Gibco	12604039
Western Blot		
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	A3678-25G
Bovines Serum Albumin (BSA)	Cell signaling	9998
Brilliant Blue R	Sigma	B0149
Bromphenolblau	Roth	A512.1
Butanol	Roth	7724.1
Coomassie Protein Assay Kit	Thermo Fisher	23200
Essigsäure	Merck	100.056
Methanol	Merck	106009

Natriumchlorid	VWR	27.810.295
Natronlauge	Roth	K021.1
Phosphatase Inhibitor	Cell signaling	5870
Ponceau S	Roth	5938.1
gefärbter Protein-Marker	Cell signaling	13953
Protease Inhibitor	Cell signaling	5871
Reduktionsmittel	Thermo Fischer	NP0004
RIPA Puffer	New England Biolabs	9806 S
Rotiophoresegel 40	Roth	A515.1
SignalFire ECL Reagenz	Cell signaling	6883
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth	4360.2
Sucrose	Sigma	S-9378
TEMED	Roth	2367.3
Tris Pufferan	Roth	4855.2
Tris-Cl	Roth	9090.3
Tris-Glycin SDS „Running“ Puffer	Cell signaling	4050
Tris-Glycin Transfer Puffer	Cell signalling	12539
TrypLE Express	Life Technologies	12604-013
Tween 20	Sigma	P1379
Geräte und Materialien Western Blot		
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad	1658003FC
blaue Kühleinheit	Bio-Rad	1703919
Filterpapier	Bio-Rad	1703932
Nitrocellulose Membran	Cell signaling	12369
Western Blot Roller	Thermofisher	84747
Antikörper Western Blot		
anti-„Rabbit“, HRP-konjugiert	Cell signaling	7074S
anti-eIF2 α	Cell signaling	9722
anti-Phospho-eIF2 α	Cell signaling	9721
anti- β -Tubulin	Cell signaling	2146

2.2 Tierversuche

Es wurden acht Wochen alte weibliche C57BL6 Mäuse (Charles River) und CHOP^{-/-} Mäuse (Jackson Laboratory, B6.129S(Cg)-Ddit3tm2.1Dron/J) in Gruppen von je vier Tieren gehalten. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Ein Käfigwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Es wurden alle geltenden Tierschutzbestimmungen und Richtlinien bei Tierversuchen eingehalten. Gemäß §8 des Tierschutzgesetzes lag eine Genehmigung der Versuche vor (Tierversuchsgenehmigung: 55.2-1-54-2532-73-2015; Regierung Oberbayern). Die Versuche wurden durch Mitarbeiter des Lehrstuhls für Neuroanatomie der LMU München durchgeführt.

2.2.1 Versuchsgruppen

Cuprizone	WT (n=4)/ CHOP ^{-/-} (n=4)	0,25% Cuprizone-Futter	
EAE	WT (n=4)/ CHOP ^{-/-} (n=4)	Normales Futter	Immunsierung mit MOG ₃₅₋₅₅
Cup-EAE	WT (n=8)/ CHOP ^{-/-} (n=8)	0,25% Cuprizone-Futter	Immunsierung mit MOG ₃₅₋₅₅

Versuchsgruppen Anzahl der Mäuse Fütterung (über 3 Wochen) EAE-Verlauf nach Immunsierung (ca. 2 Wochen)

Abbildung 7: Versuchsgruppen Mausmodell. Es wurden Wildtyp (WT) und CHOP^{-/-} Mäuse untersucht. Die Cuprizone-Gruppe erhielt eine dreiwöchige Cuprizone-Diät. Die EAE-Gruppe erhielt 3 Wochen normales Futter und wurde anschließend mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert. Die Cup-EAE-Gruppe erhielt eine dreiwöchige Cuprizone-Diät und wurde anschließend mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert. n=Anzahl der Mäuse.

Cuprizone: Die Mäuse wurden über drei Wochen mit 0,25% Cuprizone-Futter gefüttert. Das Cuprizone-Futter wurde täglich frisch angesetzt. Dafür wurden 0,5 g Cuprizone mit 200 g pulverisierten Standard-Futter homogenisiert [50].

EAE: Die Immunsierung der Mäuse erfolgte mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid. Hierfür verwendeten wir einen kommerziellen Kit (Hooke Laboratories, USA) [47, 48]. Das MOG₃₅₋₅₅-Peptid wurde in komplettem Freund-Adjuvans (Paraffinöl, Emulgator und inaktivierte Tuberkulosebakterien) gelöst. Die Lösung wurde den betäubten Mäusen subkutan in Nacken und lumbalen Rücken injiziert. Es erfolgte die zweimalige intraperitoneale Applikation von Pertussis-Toxin: am Tag der Immunsierung und 24 Stunden danach. Freund-Adjuvans und Pertussis-Toxin führen zu einer verstärkten Immunantwort [51].

Cup-EAE: Die Mäuse wurden analog der Cuprizone-Gruppe über drei Wochen mit 0,25% Cuprizone-Futter gefüttert. Nach eintägiger Pause wurden die Mäuse analog der EAE-Gruppe mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert.

2.2.2 Klinische Beurteilung der Mäuse (Scoring)

Die Mäuse der EAE und Cup-EAE-Gruppe wurden nach der Immunisierung täglich klinisch beurteilt (Scoring). Es wurden Scoring-Werte auf einer Skala von 0 bis 5 vergeben (s.Tab.2). Das Spektrum der klinischen Symptomatik kann von der am Anfang stehenden Lähmung der Schwanzspitze bis hin zu Tetraplegie und *Exitus letalis* reichen. Da die fortschreitende Parese die Mobilität der Mäuse stark einschränken kann, muss bei schlechtem klinischem Zustand die Versorgung der Mäuse sichergestellt werden. In die Käfige wurden in Wasser getränktes Futter und ein Flüssigkeitsgel gegeben. Ab einem Scoring-Wert von 2,5 wurde den Mäusen 1 ml Ringer-Lösung subkutan appliziert. Aus ethischen Überlegungen wurden in diesen Experimenten Mäuse mit einem Score von 4 aus dem Versuch genommen.

Tabelle 2: Klinische Beurteilung der Mäuse.

Score	Klinische Beobachtungen
0,0	Keine Krankheitssymptome
0,5	Lähmung der Schwanzspitze
1,0	Lähmung des kompletten Schwanzes
1,5	Gelähmter Schwanz und beginnende Lähmung der hinteren Extremitäten
2,0	Gelähmter Schwanz, Schwäche der hinteren Extremitäten und Ataxie <i>oder</i> schwere Ataxie
2,5	Fast vollständige Lähmung beider hinterer Extremitäten <i>oder</i> komplette Lähmung eines Hinterbeines
3,0	Paraplegie <i>oder</i> schwerste Ataxie
3,5	Zusätzlich zu den Symptomen bei einem Score von 3,0 kann sich das Tier aus Rückenlage nicht selbstständig aufrichten
4,0	Zusätzlich partielle Lähmung der vorderen Extremitäten
4,5	Minimale Bewegung vorhanden, apathisch
5,0	<i>Exitus letalis</i> oder Tötung aufgrund schwerwiegender Lähmung

2.2.3 Transkardiale Perfusion

Die Terminierung der Experimente erfolgte durch Tötung der Mäuse via transkardialer Perfusion. Dies erfolgte bei der Cuprizone-Gruppe nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation, bei der EAE- und Cup-EAE-Gruppe im Krankheitsmaximum (ca. 12 Tage nach Immunisierung). Die Perfusionslösung wurde am Tag der Perfusion hergestellt (s.Tab.3). Die Mäuse wurden durch die intraperitoneale Applikation von Ketamin und Xylazin betäubt. Die transkardiale Perfusion erfolgte durch Infusion von 20 ml PBS und zweimal 50 ml Perfusionslösung. Die Köpfe wurden abgetrennt und die Schädelkalotte sagittal gespalten. Die Wirbelsäulen der EAE und Cup-EAE-Mäuse wurden freipräpariert. Von einer anderen Versuchsreihe wurden die Milzen dreier

Kontrollmäuse (drei Wochen normales Futter) und dreier EAE-Mäuse entnommen. Die Präparate wurden in der Perfusionslösung 24 Stunden bei 4°C postfixiert.

Tabelle 3: Herstellung der Perfusionslösung.

Menge	Chemikalie	Bemerkung
100 ml	Formaldehyd 37%	Frisch herstellen, filtrieren und auf Eis bewahren. pH=7,40
900 ml	Aqua dest.	
4,6 g	Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	
8,0 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	

2.3 Histologie und Immunhistochemie

2.3.1 Paraffineinbettung

Die Gehirne wurden vorsichtig aus der Schädelkalotte gelöst und in Paraffin eingebettet (s.Tab.5). Die Wirbelsäulen wurden in drei zusammenhängende Segmente unterteilt. Zum Zwecke der Entkalkifizierung wurden die Wirbelsäulen zweimal 24 Stunden bei 37°C mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (s.Tab.4) behandelt und im Anschluss in Paraffin eingebettet (s.Tab.5). Nach der Einbettung wurden die Präparate in heißem, flüssigem Paraffin eingeblockt. Die Gehirne wurden so ausgerichtet, dass sich eine koronare Schnittebene ergab. Die Wirbelsäulen wurden gedrittelt und so in den Block gesetzt, dass sich auf jedem Schnitt ein zervikaler, thorakaler und lumbaler Rückenmarks-Querschnitt befand (s.Abb.8). Die Milzen wurden automatisch eingebettet (Einbettautomat, Leica ASP200S).

Tabelle 4: EDTA-Lösung.

Menge	Chemikalie	Bemerkung
80 g	EDTA	Erhitzen auf 100°C, um das EDTA zu lösen. pH=7,40
400 ml	Aqua dest.	

Tabelle 5: Paraffineinbettung.

Zeit	Substanz	Bemerkung
4 h	Fließendes Leitungswasser	
12 h	50% Ethanol	4°C
2x40 min	70% Ethanol	Raumtemperatur (RT), Agitation
3x40 min	96% Ethanol	RT, Agitation
3x40 min	100% Ethanol	RT, Agitation
3x40 min	Xylol	RT, Agitation
2x60 min	Paraffin 1, Paraffin 2	58°C
2 Tage	Paraffin 3	58°C

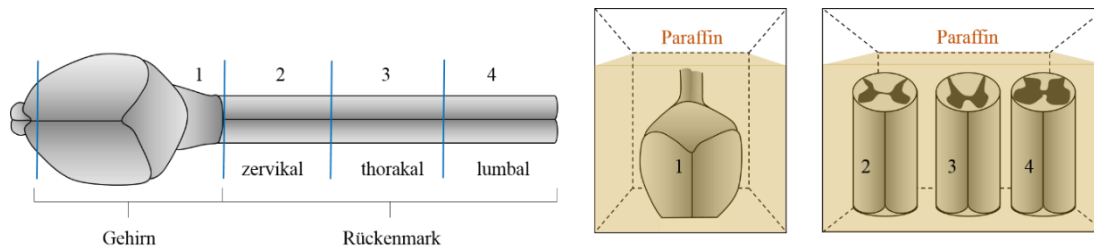


Abbildung 8: Skizze der Paraffinblöcke. Frontal wurde ein kleiner Teil des Gehirns abgetrennt. Das Gehirn wurde so in die Form gesetzt, dass sich eine koronare Schnittebene ergab (1). Das Rückenmark wurde gedrittelt und so in die Form gesetzt, dass sich auf jedem Schnitt ein zervikaler (2), thorakaler (3) und lumbaler (4) Teil befand. Die Guss-Formen wurden mit heißem, flüssigem Paraffin aufgefüllt und härteten bei Abkühlung aus.

Nach vollständiger Aushärtung der Paraffinblöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom (Leica, SM2000R) 5 µm dicke Schnittserien angefertigt. Die Gehirne wurden bis zu definierten Regionen angeschnitten. Als Orientierung diente der Mäuse-Gehirn-Atlas von Sidman et al. [49]. Es wurden die Regionen 215 (Zusammenschluss der Commissura anterior) und 265 (rostrales Ende des Hippocampus) identifiziert (s.Abb.9) und auf diese folgend jeweils 20 Objektträger mit zwei Gehirn-Schnitten pro Objektträger aufgenommen. Bei den Rückenmark- und Milz-Präparaten wurde der Block so lange angeschnitten, bis das Gewebe gut erkennbar war und darauffolgend zehn Schnitte auf Objektträger aufgenommen. Die Schnitttrocknung folgte über Nacht bei 48°C.

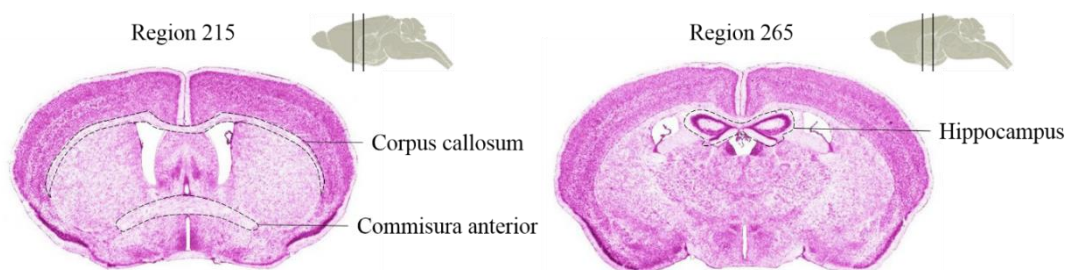


Abbildung 9: Regionen 215 und 265 (Mäuse-Gehirn-Atlas von Sidman et al.). Region 215 ist durch den Zusammenschluss der Commissura anterior charakterisiert. Region 265 ist durch das rostrale Ende des Hippocampus charakterisiert. Quelle: [49].

Die Paraffin-Schnitte wurden vor jeder Färbung durch eine absteigende Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt (Entparaffinieren und Rehydrieren). Anschließend an die Färbung wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Eindecken) geführt und mit dem Eindeckmittel DePex eingedeckt (s.Tab.6).

Tabelle 6: Entparaffinieren und Eindecken.

Zeit	Entparaffinieren	Zeit	Eindecken
3x10 min	Xylol	3 min	Aqua dest.
5 min	Xylol/Ethanol 50%/50%	3 min	50% Ethanol
2x3 min	100% Ethanol	3 min	70% Ethanol
2x3 min	96% Ethanol	2x3 min	96% Ethanol

3 min	70% Ethanol	2x3 min	100% Ethanol
3 min	50% Ethanol	5 min	Xylol/Ethanol 50%/50%
3 min	Aqua dest.	3x10 min	Xylol

2.3.2 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung ist eine der meist verbreiteten und am besten etablierten Standardfärbungen der Histologie. Das Hämatoxylin färbt Nukleinsäuren blau, das Eosin färbt Proteine rot-violett. Das Hämatoxylin liegt zunächst in einer Lösung im sauren Milieu vor (s.Tab.7: Hämatoxylin-Lösung). Die typische Blau-Färbung und ein Stabilisieren der Farbe entstehen durch eine Anhebung des pH-Wertes. Dies wird durch das „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser erreicht. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Färbeprotokoll HE.

Zeit	Arbeitsschritt/ Chemikalie	Bemerkung
	Entparaffinieren	s.Tab.6
8 min	Hämatoxylin-Lösung: 1 g Hämatoxylin 1000 ml Aqua dest. 200 mg Natriumjodat 50 g Aluminium-Kaliumsulfat-Dodecahydrat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure Monohydrat	Danach kurz in Aqua dest. (Spülen)
10 min	Fließendes Leitungswasser	Bläuen
kurz	Aqua dest.	Spülen
5 min	Eosin	Danach kurz in Aqua dest.
kurz	70% Ethanol, danach 80% Ethanol	Auswaschen der Farbe
1 min	96% Ethanol	
2x2 min	100% Ethanol	
5 min	Xylol/Ethanol 50%/50%	Aufsteigende Alkoholreihe, danach Eindecken (DePex)
2x10 min	Xylol	

2.3.3 „Luxol-Fast-Blue/Periodic-Acid-Schiff“ (LFB/PAS) Färbung

„Luxol-Fast-Blue“ (LFB) färbt Myelinscheiden blau, „Periodic-Acid-Schiff“ (PAS) färbt Kohlenhydrat-reiche Gewebe rosa/rot. In der LFB/PAS Färbung kann der Grad der Demyelinisierung in den Präparaten untersucht werden. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Jeder Schnitt wurde nach der Differenzierung lichtmikroskopisch beurteilt. Bei einer idealen Färbung soll die weiße Substanz blau und die graue Substanz rosa/rot erscheinen (s.Abb.10). Falls die Färbung zu stark erschien, wurde der Schnitt durch Lithiumcarbonat und 70% Ethanol nachdifferenziert.

Tabelle 8: Färbeprotokoll LFB/PAS.

Zeit	Arbeitsschritt/ Chemikalie	Bemerkung
	Entparaffinieren (bis 96% Ethanol)	s.Tab.6
12 h	0,1% LFB-Lösung: 0,1 g LFB 100 ml Ethanol (96%) 0,5 ml Essigsäure (100%)	Inkubation bei 56°C
kurz	96% Ethanol	Spülen
kurz	Aqua dest.	
~10 sek	0,05% Lithiumcarbonat (0,05 g Lithiumcarbonat+100 ml Aqua dest.)	Differenzierung
1 min	70% Ethanol	Auswaschen der Farbe
	Aqua dest.	mikroskopische Kontrolle
5 min	0,5% Periodsäure (0,5 g Periodsäure + 100 ml Aqua dest.)	PAS-Gegenfärbung
kurz	Aqua dest.	Spülen
10 min	Schiff'sches Reagenz	farblos
5 min	Lauwarmes, fließendes Leitungswasser	Schiff'sches Reagenz färbt sich pink
1 min	Hämatoxylin-Lösung (s.Tab.7)	Zellkern-Gegenfärbung
5 min	Fließendes Leitungswasser	„Bläuen“
	Eindecken ab 80% Ethanol	s.Tab.6

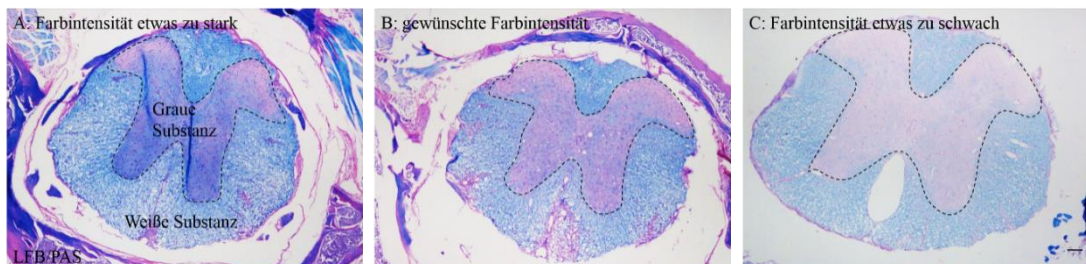


Abbildung 10: Färbe-Ergebnisse der LFB/PAS Färbung. Gezeigt sind LFB/PAS Färbungen des Rückenmarkes. A: Färberegebnis bei ungenügender Differenzierung. Die graue Substanz (mittig) ist noch blau angefärbt und lässt sich teilweise ungenügend von der weißen Substanz (umgibt die graue Substanz) abgrenzen. B: Ideales Färberegebnis. Die weiße Substanz ist blau angefärbt, die graue Substanz ist rosa/rot angefärbt. C: Schwache Farbintensität bei zu starker Differenzierung; Maßstab=100 µm.

2.3.4 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine besonders sensitive Methode, um vorwiegend proteinerge Zielstrukturen (Antigene) mithilfe von Antikörpern (AK) spezifisch nachzuweisen (s.Abb.11).

Färbeprinzip: Als erster Schritt erfolgt die Antigen-Demaskierung. Es sollen die durch die Formalin-Fixierung entstandenen Protein-Verbindungen aufgelöst und die Bindungsstellen für den Antikörper freigelegt werden. Bei der Hitze-induzierten Demaskierung werden die Präparate in einer Pufferlösung (Tris-EDTA (pH=9,0) oder Citrat (pH=6,0)) gekocht. Als nächster Schritt erfolgt eine Blockierung mit dem Serum der Spezies, in welcher der Zweitantikörper hergestellt wurde. Dies soll unspezifische

Bindungen reduzieren. Des Weiteren wird die endogene Peroxidase-Aktivität des Gewebes mit Wasserstoffperoxid inaktiviert, um eine unspezifische Umsetzung des Substrates zu verhindern. Bei der indirekten Methode einer immunhistochemischen Färbung bindet ein primärer Antikörper (1.AK) das Antigen und wird seinerseits von einem sekundären Antikörper (2.AK) gebunden. Avidin bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper und es bildet sich ein Avidin-Biotin-Komplex. Die an Avidin gebundene „Horseradish“-Peroxidase (HRP) katalysiert die Umsetzung des Substrates Diaminobenzidin (DAB). Das Produkt fällt als braune Farbe aus.

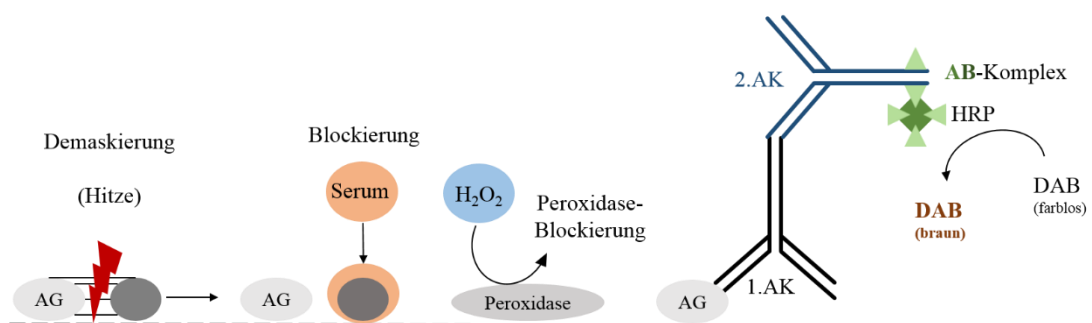


Abbildung 11: Färbeprinzip der Immunhistochemie. Die Demaskierung dient der Lösung von Protein-Quervernetzungen und Freilegung des Antigens (AG). Der Serum-Blockierungsschritt verhindert eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers. Durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird die endogene Peroxidase-Aktivität inaktiviert. Der Primärantikörper (1.AK) bindet das Antigen (AG). Der biotinylierte Sekundärantikörper (2.AK) bindet den Primärantikörper. Die an den Avidin-Biotin-Komplex gelagerte Peroxidase (HRP) katalysiert die Umsetzung des Substrates DAB.

Die Herstellung der Lösungen, das Färbeprotokoll und die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9-12 zusammengefasst. Es wurden Primärantikörper gegen „Amyloid Precursor Protein A4“ (APP), „Growth Arrest and DNA Damage-inducible Gene 153“ (GADD153=CHOP; im Folgenden als anti-CHOP bezeichnet), „Ionized Calcium-binding Adapter molecule 1“ (IBA1) und Proteolipid-Protein (PLP) verwendet. Diese dienen der Visualisierung von akutem axonalem Schaden (anti-APP), CHOP (anti-CHOP), Mikrogliazellen (anti-IBA1) und Myelin (anti-PLP). Bei jeder Färbung wurde eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper oder mit Isotypkontrolle (bei monoklonalen Antikörpern) durchgeführt.

Tabelle 9: PBS und Tris-EDTA-Puffer für IHC.

PBS 10x Stocklösung		Tris-EDTA Puffer	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
477,75 g (eine Dose)	PBS-Pulver	6,05 g	Tris
5 l	Aqua dest.	1,85 g	EDTA
PBS 1x Gebrauchslösung 1:10 in Aqua dest.		5 l	Aqua dest.
pH=7,40		pH=9,0	

Tabelle 10: Blockierungs- und Verdünnungs-Lösungen für IHC.

Menge	Chemikalie	Bemerkung
5% „Normal Goat Serum“ (NGS)		
2,5 ml	NGS	Aliquotieren (1 ml)
47,5 ml	PBS (1x)	Lagern bei -20°C
Blockierungs- und Antikörper-Verdünnungslösung der anti-APP Färbung		
1 ml	NGS	Aliquotieren (1 ml) Lagern bei -20°C
49 ml	PBS (1x)	
0,05 g	„Gelatin from Cold Water Fish“	
0,5 g	Bovines Serumalbumin (BSA)	Lagern bei 4°C
250 µl	10% Tween20 (10 ml Tween20 + 90 ml PBS)	

Tabelle 11: Färbeprotokoll IHC.

Arbeitsschritt/ Tag1	Zeit	Chemikalien	Bemerkung
Entparaffinieren			s.Tab.6
Demaskierung	10 min	Tris-EDTA-Puffer/ Keine	In Mikrowelle kochen
Abkühlen	15 min	Bad mit fließendem Leitungswasser	
Spülen	3x5 min	PBS	Agitation
Blockierung	1 h	Serum (s.Tab.10)	26°C feuchte
Primärantikörper	12 h	s.Tab.12	4°C Kammer
Arbeitsschritt/ Tag2			
Peroxidase Blockierung	30 min	0,03% H ₂ O ₂ (1 ml 30% H ₂ O ₂ + 99 ml PBS)	Agitation, Lichtgeschützt
Spülen	3x5 min	PBS	Agitation
Sekundärantikörper	1 h	s.Tab.12	26°C, feuchte Kammer
Spülen	3x5 min	PBS	Agitation
Avidin-Biotin-Komplex	1 h	ABC-Kit (A + B 1:50 in PBS)	26°C, feuchte Kammer
Spülen	3x5 min	PBS	Agitation
Visualisierung	10 min	DAB (Substrat: Stock = 1:50)	Sammeln in Leitungswasser
Eindecken			s.Tab.6

Tabelle 12: Antikörper IHC.

Primärantikörper			
Antikörper	Verdünnung	Demaskierung	gelöst in
anti-APP	1:5000	Tris-EDTA	s.Tab.10
anti-CHOP	1:400	Tris-EDTA	5% NGS
anti-IBA1	1:5000	Tris-EDTA	5% NGS
anti-PLP	1:5000	keine	5% NGS
Sekundärantikörper			
Antikörper	Verdünnung	konjugiert mit	gelöst in
anti-Kaninchen	1:200	Biotin	5% NGS
anti-Maus	1:200	Biotin	5% NGS
Isotyp-Kontrolle			

Antikörper	Die Färbung mit Isotyp-Kontrollen erfolgte als Negativkontrolle monoklonaler Antikörper analog der jeweiligen Färbung (gleiche Konzentration wie der 1.AK).
IgG2a	
IgG2b	

2.3.5 Immunfluoreszenz (IF)

Das Detektionssystem der Immunfluoreszenz (IF) setzt sich ebenfalls aus Primär- und Sekundärantikörper zusammen. Der Sekundärantikörper ist an einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden. Es wurde eine Fluoreszenz-Doppelfärbung zur Detektion von CHOP (anti-CHOP) und Oligodendrozyten (anti-„Oligodendrocyte Transcription factor“ (OLIG2)) durchgeführt (s.Abb.12).

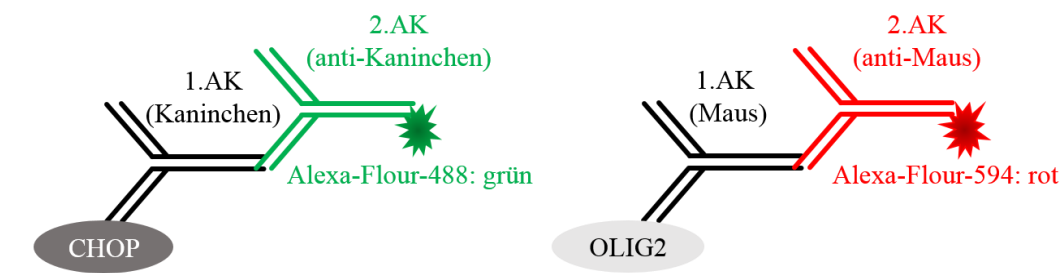


Abbildung 12: Prinzip der fluoreszierenden Doppelfärbung. Die Detektion erfolgt anhand zweier Primärantikörper aus verschiedenen Spezies (anti-CHOP: Kaninchen; anti-OLIG2: Maus). Diese können nun von zwei verschiedenen Sekundärantikörpern (anti-Kaninchen (grün fluoreszierend) und anti-Maus (rot fluoreszierend)) detektiert werden.

Die Arbeitsschritte Entparaffinieren, Demaskierung, Blockierung und Inkubation des Primärantikörpers erfolgten analog der chromogenen Immunhistochemie (s.Tab.11). Die beiden Primärantikörper (anti-OLIG2 und anti-CHOP) wurden simultan inkubiert. Ebenso erfolgte die simultane Inkubation beider Sekundärantikörper (Alexa Flour 488 und 594). Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid blau-fluoreszierend angefärbt. Das Protokoll der Immunfluoreszenz unterscheidet sich in den Blockierungs- und Verdünnungs-Lösungen (s.Tab.13), dem Färbeprotokoll des zweiten Tages (s.Tab.14) und den verwendeten Antikörpern (s.Tab.15) von dem Protokoll der IHC.

Tabelle 13: Blockierungs- und Verdünnungs-Lösungen für IF.

Menge	Chemikalie	Bemerkung
Blockierungs- und Antikörper-Verdünnungslösung 1.AK		
1 ml	„Normal Donkey Serum“	Aliquotieren (1 ml) Lagern bei -20°C
0,05 g	„Gelatin from Cold Water Fish“	
0,5 g	BSA	
49 ml	PBS	Lagern bei 4°C
250 µl	10% Tween20 (10 ml Tween20 + 90 ml PBS)	
Antikörper-Verdünnungslösung 2.AK		
2,5 ml	„Normal Donkey Serum“	Aliquotieren (1 ml)
47,5 ml	0,5% Triton X-100 (in PBS)	Lagern bei -20°C

Tabelle 14: Färbeprotokoll IF.

Arbeitsschritt/Tag1	Analog der chromogenen IHC (s.Tab.11)		
Arbeitsschritt/Tag2	Zeit	Chemikalien	Bemerkung
Sekundärantikörper	2 h	s.Tab.15	Agitation, 26°C Lichtgeschützt,
Spülen	3x5 min	PBS	
Kernfärbung	5 min	Bisbenzimid	Lichtgeschützt
Spülen	2x5 min	Aqua dest.	
wässrig Eindecken		“Fluor Preserve Reagent“	

Tabelle 15: Antikörper IF.

Primärantikörper	Verdünnung	Demaskierung
anti-CHOP	1:200	Tris-EDTA
anti-OLIG2	1:2000	Tris-EDTA
Sekundärantikörper	Verdünnung	Farbe Fluoreszenz
Alexa Flour 488	1:200	grün
Alexa Flour 594	1:200	rot

2.4 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen aus einem Gewebehomogenat. Die Proteine werden zuerst mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die negativ geladenen Proteine laufen im angelegten Spannungsfeld zur positiv geladenen Anode. Da kleinere Proteine schneller durch das Gel-Netz laufen als große, werden die Proteine nach ihrer Größe in Banden aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proteinproben wird ein Standard-Marker aufgetragen, anhand dessen das Molekulargewicht der eigenen Proben abgeschätzt werden kann. Das eigentliche „Blotting“ bezeichnet den Transfer der im Gel aufgetrennten Proteinbanden auf eine Trägermembran. Die Proteine werden durch Anlage elektrischer Spannung auf die Membran übertragen. Die auf der Membran gebundenen Proteine sind für Nachweisverfahren, beispielsweise Antikörper Färbungen, zugänglich. In der vorliegenden Studie wurde in Oligodendrozyten-Zell-Lysaten die Expression von β -Tubulin, eIF2 α und P-eIF2 α durch Western Blot bestimmt.

2.4.1 Vorbereitung der Zellen

Die Kultivierung, Behandlung und das Ablösen der Zellen wurde durch Mitarbeiter des Lehrstuhls für Neuroanatomie der LMU München durchgeführt. Es wurden zwei Oligodendrozyten-Zelllinien kultiviert: die aus Ratten stammenden OLN-93 Zellen [52] und murine Oli-Neu Zellen [53].

Es wurden PDL-beschichtete 6-Well Platten vorbereitet. In jedes Well wurde 1 ml PDL-Gebrauchslösung (s.Tab.16) gegeben und eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂

inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das Experimentalmedium (s.Tab.16-17) vorgelegt. Die in Zellkulturflaschen kultivierten Zellen hatten mindestens Subkonfluenz erreicht. Nach Absaugen des Mediums wurde einmalig mit DPBS gewaschen und 3 ml TrypLE Express hinzugefügt. Nach Ablösen der Zellen wurden 7 ml PBS/10% FCS hinzugegeben, die Zellen suspendiert und in einen Falcon überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation (300g, RT) wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Experimentalmedium resuspendiert und mit 9 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden mithilfe des Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, MCH100101) ausgezählt und die Konzentration pro Milliliter berechnet. Die Zellen wurden in die PDL-beschichteten 6-Well-Platten ausgesät (Gesamtvolumen: 1900 µl, Zellzahl pro Well: 5×10^5). Es folgte eine Inkubation der Zellen für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂.

Tabelle 16: PDL-Lösung und Sato-Medium Zellkultur.

Menge	Chemikalie	Bemerkung
PDL-Stocklösung 10x		
5 mg	PDL	Für 1x PDL-Gebrauchslösung 1:10 in Aqua dest. verdünnen
50 ml	UPH ₂ O	
Sato-Medium		
50 ml	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“	5% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin
500 µl	N2-Supplement	
50 µl	3,3,5-Triiod-L-Thyronin Natrium Salz	TIT
8 µl	L-Thyroxin	
125 µl	Gentamicin	
1 ml	„Horse Serum“ (HS)	nur bei 2% HS, keines bei 0% HS

Tabelle 17: Kultivierungs- und Experimentalmedien Zellkultur.

Zelllinie	OLN-93	Oli-Neu
Kultivierungsmedium	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“	Sato 2% HS
Experimentalmedium	Sato 0% HS	Sato 2% HS

Thapsigargin-Behandlung und Probenaufarbeitung: Eine Thapsigargin-Stocklösung wurde angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Versuche wurde eine Thapsigargin-Verdünnungsreihe erstellt (s.Tab.18). Zu dem in jeder Well-Platte vorgelegten Medium (1900 µl) wurden 100 µl der Thapsigargin-Lösungen gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Tabelle 19 zeigt die im Versuch erreichten Thapsigargin-Konzentrationen.

Tabelle 18: Thapsigargin-Verdünnungsreihe.

Stocklösung	Thapsigargin 1 mg	Ethanol 1,23 ml	1,25 mM
	Volumen Thapsigargin	Volumen Medium	Konzentration
Lösung A	27 µl (Stocklösung)	1373 µl	24000 nM
Lösung B	700 µl (von A)	700 µl	12000 nM
Lösung C	700 µl (von B)	700 µl	6000 nM

Tabelle 19: Versuchsgruppen der Thapsigargin-Behandlung.

Gruppe	Volumen Thapsigargin	Volumen Medium	Konzentration
A	100 µl von Lösung A	1900 µl	1200 nM
B	100 µl von Lösung B	1900 µl	600 nM
C	100 µl von Lösung C	1900 µl	300 nM
D	100 µl von Medium	1900 µl	0 nM (Kontrolle)

Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und einmalig mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 500 µl TrypLE Express abgelöst und die Ablösungs-Reaktion mit 1 ml PBS abgestoppt. Die gelösten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 5 Minuten zentrifugiert (300g, RT). Der Überstand wurde verworfen.

Bei allen folgenden Schritten wurden die Proben auf Eis gelagert. Jedes Zellpellet wurde in 200 µl RIPA-Puffer mit beigemischem Protease-Inhibitor und Phosphatase-Inhibitor lysiert. Der Protease-Inhibitor hemmt eine Selbstverdauung durch zelleigene Proteasen. Der Phosphatase-Inhibitor hemmt den Abbau des phosphorylierten eIF2 α durch zelleigene Phosphatasen. Nach 15 Sekunden Ultraschallbehandlung (UP200S, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland) wurden die Proben für 10 Minuten zentrifugiert (14000g, 4°C). Der Überstand (Probe) wurde abgenommen und der abzentrifugierte Zellschutt wurde verworfen.

2.4.2 Bradford-Assay

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mithilfe des Bradford Assays photometrisch bestimmt. Der verwendete Comassie-Farbstoff färbt sich bei Zugabe zu einer Proteinlösung blau. Der Farbumschlag und die Verschiebung des Absorptionsmaximums können photometrisch gemessen werden und sind proportional zur Proteinkonzentration. Die notwendige Kalibrierung erfolgte anhand einer standardisierten BSA-Verdünnungsreihe (s.Tab.20).

Tabelle 20: BSA-Standard Bradford Assay.

Probe	PBS	Volumen und Quelle BSA	BSA Konzentration
A	2370 µl	30 µl von Stock	25 µg/ml
B	4950 µl	50 µl von Stock	20 µg/ml
C	3970 µl	30 µl von Stock	15 µg/ml
D	2500 µl	2500 µl von Probe B	10 µg/ml
E	2000 µl	2000 µl von Probe D	5 µg/ml
F	1500 µl	1500 µl von Probe E	2,5 µg/ml
G	5000 µl	0 = Reagenzien-Blindwert	0 µg/ml

Die Zell-Proben wurden 1:100 mit PBS verdünnt. In einer 96-Well-Platte wurden von den BSA-Standard-Verdünnungslösungen und den Proben jeweils 150 µl vorgelegt. Um Messungenauigkeiten des Systems zu minimieren, wurde jede Probe dreimal aufgetragen. Zu jeder Probe und jedem BSA-Standard wurden 150 µl Coomassie Reagenz gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die in den Proben enthaltenen Proteine bewirkten einen Farbumschlag des Coomassie-Reagenzes von braun zu blau. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen (SpectraMax M3, Molecular devices, Kalifornien, USA). Anhand der Absorptionswerte der BSA-Standardreihe wurde mithilfe der GraphPad-Prism-Software (GraphPad Software inc., Version 5.04 für Windows; San Diego California, USA) eine Eichgerade erstellt. Durch Einsetzen der gemessenen Absorption der Proben in die Geradengleichung wurden die Protein-Konzentrationen errechnet. Anhand der Proteinmenge konnte das benötigte Proben-Volumen für ein Gesamt-Volumen von 20 µl, welches 10 µg Protein enthalten soll, berechnet werden (s.Abb.13). Die Proben wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

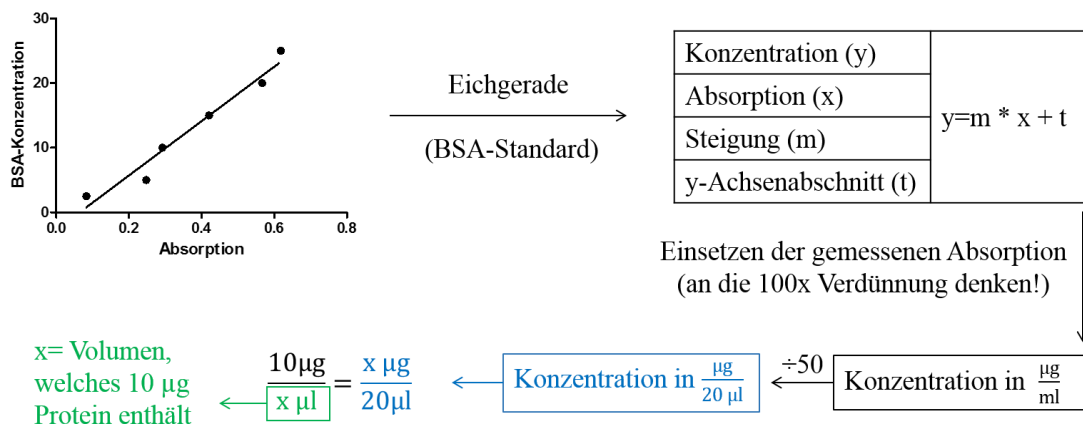


Abbildung 13: Berechnung der Proteinkonzentration (Bradford-Assay). Anhand der BSA-Standardreihe wurde eine Eichgerade und deren Geradengleichung erstellt. Anhand der gemessenen Absorption der Proben konnte deren Protein-Konzentration in µg/ml berechnet werden. Die 100fache Verdünnung der Proben ist bei der Rechnung zu berücksichtigen. Mit der erhaltenen Konzentration (blauer Kasten) und der Vorgabe, dass 10 µg Protein in 20 µl Gesamt-Volumen enthalten sein soll, konnte das benötigte Proben-Volumen (grüner Kasten) errechnet werden.

2.4.3 SDS-Elektrophorese und Blotting

Es wurden zwei Elektrophorese-Gele (Sammelgel und Trenngel) gegossen. Im Sammelgel kommt es zu einer Konzentrierung der Proteine, im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine. Als Guss-Form für die Gele dienten zwei Glasplatten mit Abstandshaltern, welche in einem abgedichteten Ständer eingespannt waren. Das Trenngel wurde hergestellt (s.Tab.22) und bis zu einer festgelegten Markierung zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend wurde das Gel mit 500 µl Butanol bedeckt, um Luftblasen zu verhindern. Zur Polymerisation wurde das Gel mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde das Butanol mithilfe eines Filterpapiers abgesaugt und dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde das Sammelgel hergestellt (s.Tab.22), auf das feste Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Zur Polymerisation wurde das Gel mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die Taschen für die Proben entstanden durch Herausziehen des Kammes.

Tabelle 21: Puffer für Elektrophorese-Gele.

Trenngel-Puffer		Sammelgel-Puffer	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
36,94 g	Tris Pufferan	18,91 g	Tris-Cl
0,8 g	SDS 0,4%	0,8 g	SDS 0,4%
200 ml	Aqua dest.	200 ml	Aqua dest.
Bei 4°C lagern, pH=8,8		Bei 4°C lagern, pH=6,8	

Tabelle 22: Trenn- und Sammelgel.

Trenngel (10%)		Sammelgel	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
3 ml	Aqua dest.	1600 µl	Aqua dest.
1,5 ml	Rotiophoresegel 40	313 µl	Rotiophoresegel 40
1,5 ml	Trenngel-Puffer (s.Tab.21)	625 µl	Sammelgel-Puffer (s.Tab.21)
60 µl	10% APS (0,1 g APS + 1 ml Aqua dest.)	25 µl	10% APS (0,1 g APS + 1 ml Aqua dest.)
6 µl	TEMED	2,5 µl	TEMED

Die bei -80°C gelagerten Zell-Proben wurden zum Auftauen auf Eis gelegt. Die Proben wurden mit PBS verdünnt, sodass sich eine Gesamtmenge von 10 µg Protein pro 20 µl Probe ergab (Berechnungen des Bradford Assays). Zu den 20 µl Probe wurden 2 µl Reduktionsmittel und 4 µl Laemmli-Puffer (s.Tab.23) gegeben. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, kurz zentrifugiert und weiter auf Eis gelagert.

Tabelle 23: Laemmli-Puffer.

Menge	Chemikalie	Bemerkung
0,5 g	Tris Pufferan	Aliquotieren (1ml) und Lagern (-20 °C) pH=6,8
1 g	SDS (Natriumdodecylsulfat)	
5 g	Sucrose	
1 Prise	Bromphenolblau	
50 ml	Aqua dest.	

Die Glasplatten mit Gel wurden in die Elektrophorese-Einheit der Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1x Tris-Glycin-SDS-Puffer (s.Tab.24) gefüllt. Mittig wurde ein vorgefärbter Protein-Marker in die Gel-Tasche gegeben. Beidseits des Markers wurde jede Probe zweimal aufgetragen (s.Abb.14). Es wurde für 10 Minuten eine Spannung von 80 V (250 mA) und für etwa 60 Minuten eine Spannung von 160 V (250 mA) angelegt.

Tabelle 24: Puffer für Western Blot.

SDS-Puffer (Elektrophorese)		Transfer-Puffer	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
100 ml	10x Tris-Glycin SDS Puffer	100 ml	10x Tris-Glycin Transfer Puffer
900 ml	Aqua dest.	700 ml	Aqua dest.
		200 ml	Methanol

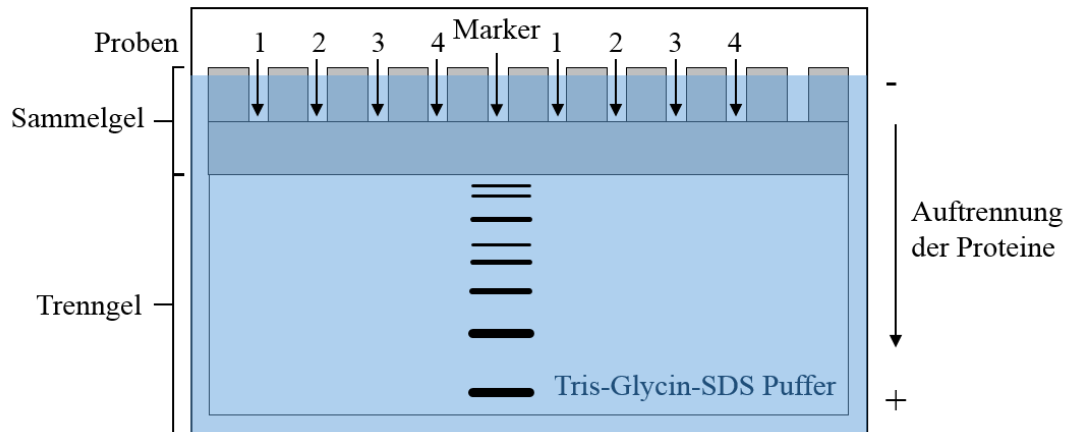


Abbildung 14: Aufbau einer Elektrophorese-Kammer. Die Proben wurden in die Taschen des Sammelgels gegeben. Der Marker wurde mittig aufgetragen. Die Proben (1-4) wurden links und rechts des Markers zweimal aufgetragen. Durch die angelegte Spannung wurden die Proteine im Trenngel gemäß ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Anhand des Markers konnten die entstandenen Banden und Auftrennung der Proteine verfolgt werden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und 10-15 Minuten in Transfer-Puffer (s.Tab.24) belassen. Das Blotting-Sandwich wurde zusammengesetzt (s.Abb.15) und in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Diese wurde mit Transfer-Puffer befüllt. Es wurde eine Kühleinheit in die Kammer gegeben und für 90 Minuten eine Spannung von 30 V (250 mA) angelegt.

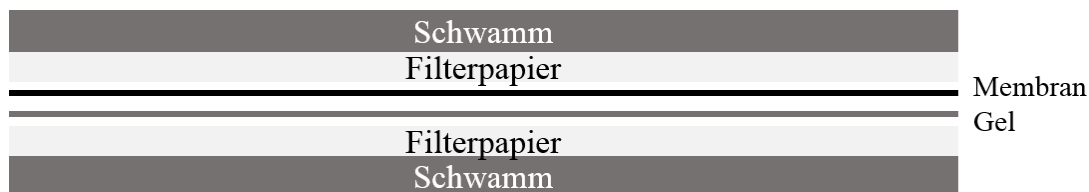


Abbildung 15: Aufbau des Blotting-Sandwich. Um die Proteine von dem Gel auf die Membran zu übertragen, wurden Gel und Membran zwischen Filterpapieren und Schwämmen luftblasenfrei und komplett überlagernd zusammengebracht.

Zur Kontrolle des Transfers wurden erfolgreich auf die Membran übertragene Proteine und im Gel verbliebene Proteine temporär angefärbt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Das Gel wurde für mindestens 30 Minuten in einer Fixierungs-Lösung fixiert und über Nacht in der Coomassie Blau Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Farbe schrittweise mit der Entfärbungs-Lösung herausgewaschen. Falls die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran nicht erfolgreich gewesen wäre, würden sich im Gel blau angefärbte Banden finden. Die Membran wurde für 1-2 Minuten mit Ponceau S (s.Tab.25) angefärbt. Anschließend wurde die Farbe durch zweimaliges Spülen mit destilliertem Wasser und einmaligem Spülen mit TBS (s.Tab.26) ausgewaschen. Erfolgreich übertragene Proteine stellten sich rot dar. Die rot angefärbten Banden verifizierten eine erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran und dienten der Abschätzung der Proteinmengen. Die rot gefärbten Banden dienten zudem als Orientierung, um die Membran für die anschließende Antikörperfärbung zu teilen (s.Abb.16).

Tabelle 25: Lösungen für Coomassie Blau und Ponceau S Färbung.

Fixierungs Lösung		Entfärbungs Lösung	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
200 ml	Aqua dest.	168,8 ml	Aqua dest.
250 ml	Methanol	62,5 ml	Methanol
50 ml	Essigsäure	18,7 ml	Essigsäure
Comassie Blau Lösung		Ponceau S Lösung	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
0,625 g	Brilliant Blue R	0,25 g	Ponceau S
250 ml	Fixierungs-Lösung	250 ml	5% Essigsäure

Tabelle 26: TBS und TBST Stocklösungen.

10x TBS		10x TBST	
Menge	Chemikalie	Menge	Chemikalie
48,44 g	Tris Pufferan	990 ml	10x TBS
175,4 g	NaCl	10 ml	Tween20
2 l	Aqua dest.		
Für die Gebrauchslösungen 10x Stock 1:10 mit Aqua dest. verdünnen, pH=7,4			

2.4.4 Protein-Nachweis

Die Membran wurde für die Antikörperfärbung geteilt (s.Abb.16). Es wurde ein Detektions-System aus einem Primärantikörper (bindet Protein) und einem Sekundärantikörper (bindet Primärantikörper) verwendet. Die an den Sekundärantikörper gebundene HRP katalysiert die Umsetzung eines „Enhanced Chemiluminescence“(ECL)-Substrates. Die bei der Visualisierung entstandene Chemilumineszenz wurde mithilfe eines CCD-Sensors (FluorchemE, Protein simple; Kalifornien, USA) aufgenommen. Das Färbeprotokoll und die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 27-28 zusammengefasst.

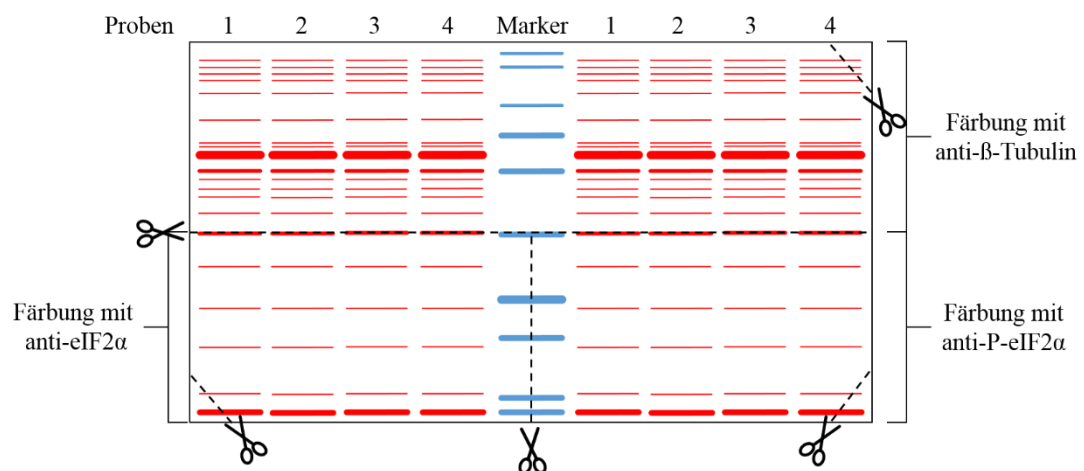


Abbildung 16: Skizze der Western Blot Membran. Die Proteinbanden wurden durch Ponceau S rot angefärbt. Die Membran wurde horizontal entlang der 47 kDa Bande geteilt. Die obere Hälfte wurde mit β -Tubulin (55 kDa) angefärbt. Die untere Hälfte wurde vertikal mittig entlang des Markers (blau) geteilt. Eine Hälfte wurde mit eIF2 α (37 kDa), die andere Hälfte mit P-eIF2 α (37 kDa) gefärbt. Um nach der Färbung die ursprüngliche Ausrichtung der Membran nachzuvollziehen zu können, wurden die Ecken angeschnitten.

Tabelle 27: Färbeprotokoll Western Blot Membran.

Schritt	Zeit	Menge	Chemikalien	Bemerkung
Blockierung	30 min	50 ml	BSA/TBS (2,5 g BSA + 50 ml TBS)	RT
Waschen	3x10 min	3x50 ml	TBST	4°C Agitation
1.AK	über Nacht	5 ml	AK (s.Tab.28)	
Waschen	3x10 min	3x50 ml	TBST	
2.AK	2 h	5 ml	AK (s.Tab.28)	RT
Waschen	3x10 min	3x50 ml	TBST	
Visualisierung	1 min	10 ml	ECL Reagenz	5 ml A + 5 ml B

Tabelle 28: Antikörper Western Blot.

1.AK	Verdünnung	Bemerkung	
anti- β -Tubulin	1:1000	Inkubation der Membran in 5 ml AK-Lösung (Einschweißen in eine Plastikfolie)	
anti-eIF2 α	1:1000		
anti-P-eIF2 α	1:1000		
2.AK	Verdünnung	konjugiert mit	
anti-Kaninchen	1:1000	in BSA/TBST	HRP

2.5 Methoden der Auswertung

2.5.1 Auswertung Histologie

Aufnahmen chromogener Färbungen wurden mit einem am Mikroskop (Eclipse E200, Nikon) installierten Kamerasystem (Digital sight DS-2Mv und DS-L2 Mikroskop Kontroll-Einheit, Nikon) angefertigt. Für computergestützte Bildauswertungen wurde die frei verfügbare ImageJ-Software (ImageJ Software 2.0.0. für Windows; Wayne Rasband, NIH, USA) verwendet.

Demyelinisierung im Corpus callosum (LFB/PAS Färbung): In der LFB/PAS Färbung stellen sich Myelinscheiden blau und demyelinisierte Areale rosa/rot dar. Die Beurteilung der Demyelinisierung erfolgte durch Einteilung in prozentuale Schweregrade (sogenanntes „Grading“: s.Tab.29 und Abb.17). Die Einschätzung des Demyelinisierungsgrades erfolgte verblindet durch drei unabhängige Mitarbeiter (Clarner T., Gottschling M., Nyamoya S.).

Tabelle 29: Beurteilung der Demyelinisierung (LFB/PAS).

Prozent	Demyelinisierung	Blau angefärbte Myelinscheiden
100%	keine (voll myelinisiert)	lückenlos, dicht
75%	teilweise	aufgelockert
50%	teilweise	sehr lückenhaft
0%	vollständig demyelinisiert	kaum/ keine

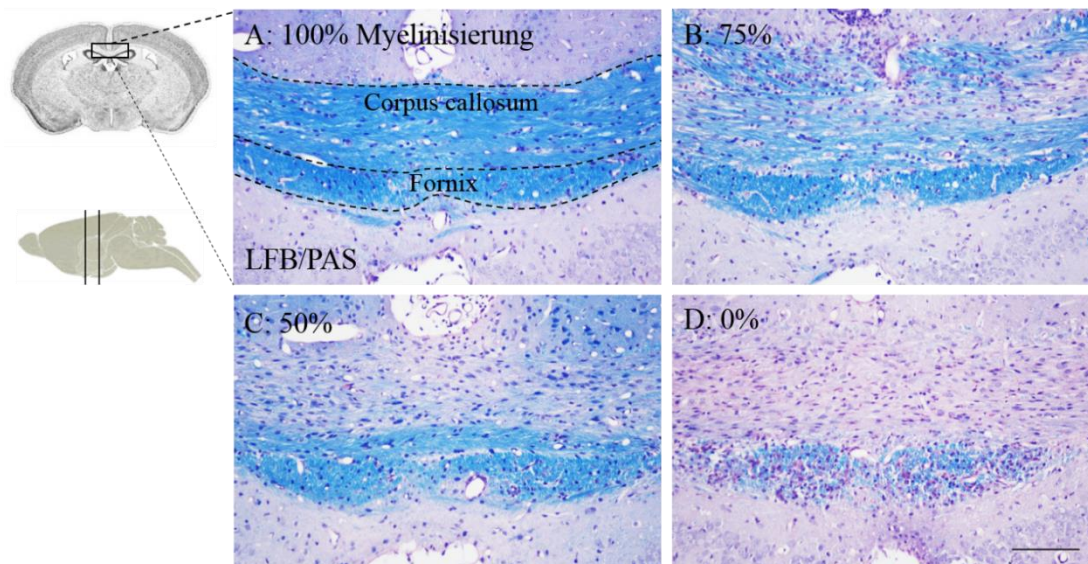
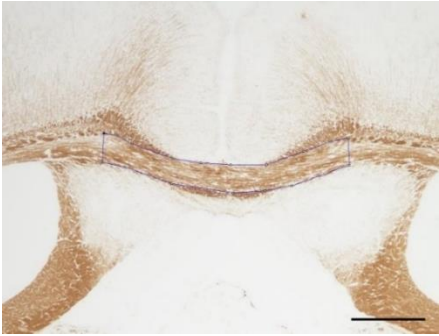
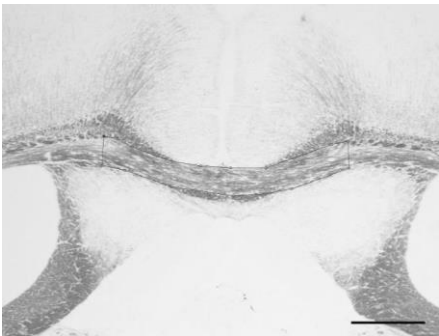



Abbildung 17: Demyelinisierungsgrade des Corpus callosum (LFB/PAS). Gezeigt sind Ausschnitte des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus. A (100%): Das blau angefärbte Myelin ist dicht und lückenlos. B (75%): Das Myelin erscheint aufgelockert. C (50%): Das Myelin erscheint sehr lückenhaft. D (0%): Es ist (fast) kein blau angefärbtes Myelin zu erkennen; Maßstab=100 µm.

Demyelinisierung und Mikrogliose im Corpus callosum (Dichtemessungen): Die Dichte der anti-PLP und anti-IBA1 Färbeintensität im Corpus callosum wurde mithilfe der ImageJ-Software ausgewertet (s.Tab.30). Die Dichte von Myelinscheiden wurde in anti-PLP gefärbten Schnitten quantifiziert. Die Dichte von Mikroglia-Zellen wurde in anti-IBA1 gefärbten Schnitten quantifiziert. Es wurde das mediale Corpus callosum in den Regionen 215 und 265 untersucht. Zuerst wurde die zu untersuchende Region (Corpus callosum) markiert. Es folgte die Umwandlung der Bilder in ein Schwarz-Weiß-Format (binäres Bild) und die Messung der relativen Dichte („Area“).

Tabelle 30: Arbeitsschritte der Dichte-Auswertung (ImageJ).

ImageJ Funktion	Abbildung	Beschreibung
- <i>polygonale Auswahl</i>		Die zu untersuchende Region (mediales Corpus callosum) wurde bei jedem Schnitt umrandet (Blaue Umrandung). Maßstab=500 µm.
- <i>Image</i> - <i>Type</i> - <i>8bit</i>		Mit der „8bit“ Funktion erfolgte die Umwandlung in ein Grau-Format.
- <i>Image</i> - <i>Adjust</i> - <i>Threshold</i> - <i>strg + M</i>		Nach Umwandlung des Bildes von grau zu binär mittels eines Thresholds wurde die relative Dichte der ausgewählten Region gemessen (strg + M). Das Ergebnis wurde in Prozent der Fläche angegeben.

Quantifizierung von Strukturen im Corpus callosum: Durch einen gestörten anterograden axonalen Transport kann es zu einer Akkumulation des Membran-Proteins APP kommen. Diese Akkumulation kann in APP gefärbten Schnitten in Form von APP-Sphäroiden visualisiert werden (s.Abb.18). Durch die Anzahl an APP-Sphäroiden kann das Ausmaß von akutem axonalem Schaden quantifiziert werden [42]. Die Quantifizierung von APP-Sphäroiden erfolgte mithilfe der ImageJ-Software. Es wurde eine Fläche im medialen Corpus callosum abgegrenzt und gemessen. Anschließend erfolgte mithilfe der „Cell Counter“-Funktion die manuelle Zählung der APP-Sphäroide (Zielstrukturen) innerhalb der gewählten Fläche. Das Ergebnis wurde in Anzahl pro Fläche (mm²) angegeben. Nach gleichem Prinzip wurden CHOP-positive Zellen im medialen Corpus callosum ausgezählt (s.Abb.18).

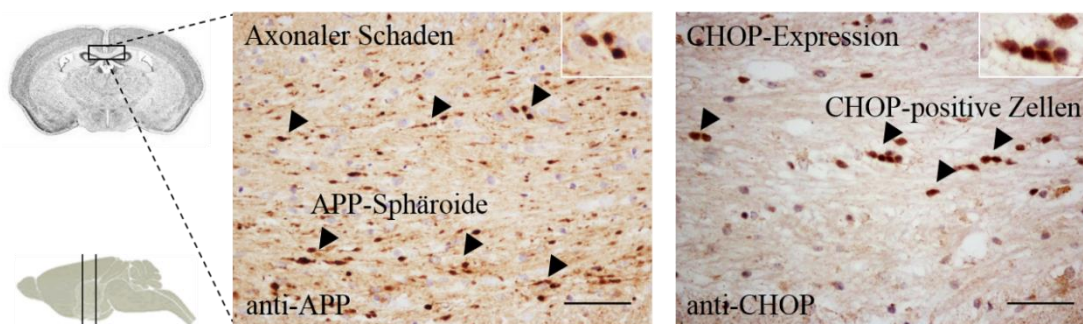


Abbildung 18: Auszählen von APP-Sphäroiden und CHOP-positiven Zellen. Gezeigt sind Ausschnitte des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus. Einige APP-Sphäroide und CHOP-positive Zellen sind durch Pfeilköpfe hervorgehoben. Rechts oben findet sich eine Vergrößerung ausgewählter APP-Sphäroide und CHOP-positiver Zellen; Maßstab=50 µm.

Ko-Lokalisation von CHOP und OLIG2: In der CHOP-OLIG2-Doppelfärbung wurde die Antigen-Ko-Lokalisation beurteilt. Mit einem „Disk Scanning Unit“-Mikroskop (Olympus BX51WI, UPL-SAPO 60x0) wurde das Corpus callosum in allen Kanälen (rot, blau, grün) mit einem 60er Objektiv (Öl) eingescannt. Mithilfe der Software Stereoinvestigator (MicroBrightField; Williston, USA) wurde bei grün-fluoreszierenden (CHOP-positiven) Zellen eine Markierung gesetzt und anschließend die Ko-Lokalisation der gesetzten Markierungen mit rot-fluoreszierenden (OLIG2-positiven) Zellen bestimmt.

Entzündliche Demyelinisierung des Rückenmarkes (LFB/PAS Färbung): Der Demyelinisierungsgrad des Rückenmarkes wurde mithilfe der ImageJ-Software quantifiziert. Es wurde die gesamte Fläche und die entzündlichen Demyelinisierungsherde der weißen Substanz ausgemessen (s.Abb.19). Das Ergebnis

wurde als prozentualer Anteil der demyelinisierten Fläche bezogen auf die gesamte weiße Substanz angegeben.

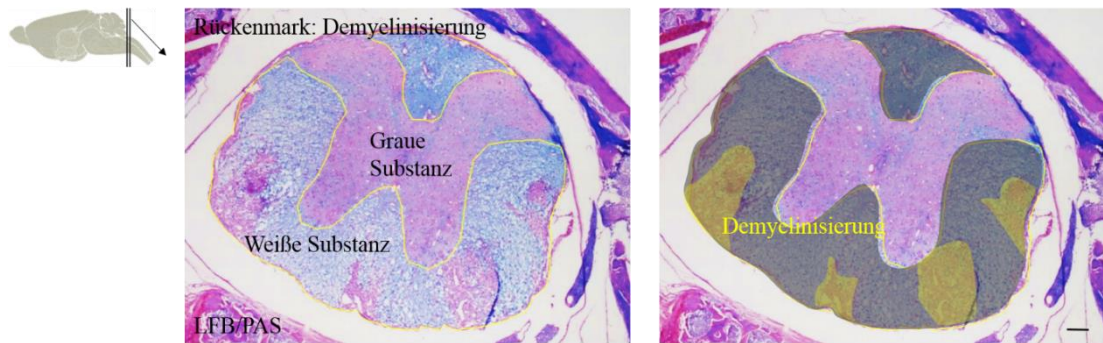


Abbildung 19: Quantifizierung der Rückenmark-Demyelinisierung (LFB/PAS). Myelin ist blau angefärbt, demyelinisierte Areale sind rosa/rot angefärbt. Es wurde die Fläche der demyelinisierten Areale (gelbe Schattierung) im Verhältnis zur Fläche der gesamten weißen Substanz (graue und gelbe Schattierung) gemessen; Maßstab=100 µm.

Perivaskuläre Infiltrate: Die Anzahl der perivaskulären Infiltrate (englisch „Perivascular Cuff“ (PVC)) wurde in HE und anti-IBA1 gefärbten Präparaten manuell ausgezählt. Die Zählung erfolgte durch zwei unabhängige, verblindete Mitarbeiter (Gottschling M., Rohr S.O.). Histologisch ist ein PVC in der HE Färbung durch die mehrschichtige Akkumulation von Leukozyten um das gut erkennbare Lumen einer postkapillären Venole charakterisiert (s.Abb.20).

Die Anzahl an APP-Sphäroiden und deren Abstand zum PVC-Zentrum wurden mithilfe der ImageJ-Software quantifiziert. Mithilfe der „Enlarge ROI“-Funktion wurden konzentrische Kreise in einem Abstand von jeweils 20 µm um das Gefäß gelegt und die Anzahl der APP-Sphäroide in den entstandenen Arealen manuell ausgezählt (s.Abb.20).

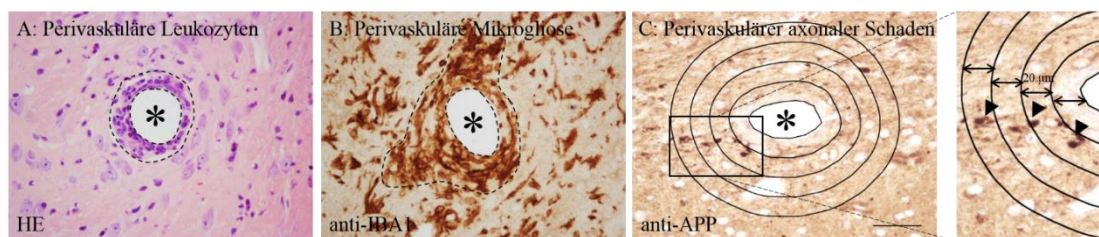
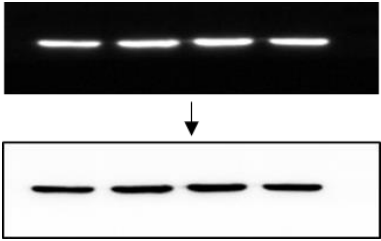
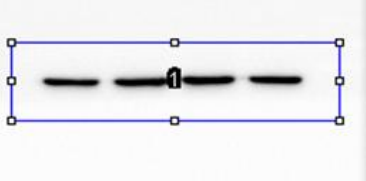

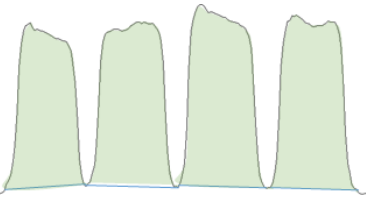
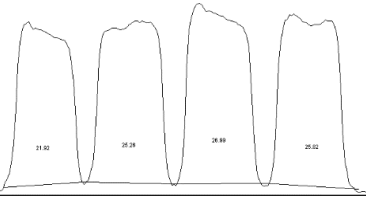


Abbildung 20: Histologische Charakteristika perivaskulärer Infiltrate. A: HE Färbung. Um das Gefäßlumen (*) zeigt sich eine mehrschichtige Akkumulation von Leukozyten (klein, rund, basophiler Zellkern). Das Ausmaß der Infiltration ist durch gestrichelte Linien markiert. B: anti-IBA1 Färbung. Um das Gefäßlumen (*) zeigt sich eine Akkumulation von IBA1-positiven Zellen. Das Ausmaß der Akkumulation ist durch gestrichelte Linien markiert. C: anti-APP Färbung. Die mithilfe der ImageJ-Software konstruierten konzentrischen Areale lagen im Abstand von 20 µm um das Gefäßlumen (*). Die Pfeilköpfe heben APP-Sphäroide hervor; Maßstab=50 µm.

2.5.2 Auswertung Western Blot

Die Auswertung der mit der CCD-Kamera aufgenommenen Banden erfolgte mithilfe der ImageJ-Software. Die Arbeitsschritte und benötigten ImageJ Funktionen sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tabelle 31: Arbeitsschritte der Western Blot Auswertung (ImageJ).

ImageJ Funktion	Abbildung	Beschreibung
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Invert</i> - <i>Rotate</i> - <i>Brightness/Contrast</i> 		<p>Nach dem Umkehren der Farben („Invert“) erschienen die Banden schwarz auf weißem Hintergrund. Bei Bedarf: Rotation des Bildes und Einstellen von Kontrast/Helligkeit.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Rechteck</i> - <i>Select line (strg + 1)</i> 		<p>Umranden (Rechteck) und Auswählen (strg + 1) der Banden.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Plot lanes (strg + 3)</i> 		<p>Durch „strg + 3“ kann die Dichte der Banden graphisch dargestellt werden.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Linie</i> - <i>Zauberstab</i> 		<p>Mit einer Linie (blau) wurden die Minima der Kurven verbunden. Die Fläche unter den Kurven wurde mit dem Zauberstab-Tool markiert.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Label peaks</i> 		<p>Es wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Flächen von der Gesamtfläche angegeben.</p>

Die Dichtemessung (s.Tab.31) erfolgte für die β -Tubulin, eIF2 α und P-eIF2 α gefärbten Banden. Der Versuch wurde für jede Versuchsgruppe (A-D) dreimal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die Dichtewerte der β -Tubulin-Ladekontrollen repräsentieren die Unterschiede im Gesamtprotein, welche normiert werden sollten. Hierfür wurden die Ergebnisse der Dichtemessung von eIF2 α und P-eIF2 α ins Verhältnis zu den Dichtemessungen der entsprechenden Ladekontrolle (β -Tubulin) der Probe gesetzt. Die Messwerte wurden zunächst normiert, indem jeder Messwert einer Versuchsreihe durch einen Bezugsmesswert dividiert wurde (Beispiel: alle Werte der eIF2 α -Messung bei OLN93 Zellen (A1-3 bis D1-3) wurden durch A1 dividiert). Die normierten Werte der Dichte von eIF2 α und P-eIF2 α wurden durch die normierten Werte der β -Tubulin-Dichtemessung der gleichen Probe dividiert (Beispiel: eIF2 α (A1) / β -Tubulin(A1)).

2.5.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der GraphPad-Prism-Software (GraphPad Software inc., Version 5.04 für Windows; San Diego California, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Unterschiede zweier Versuchsgruppen (WT vs. CHOP^{-/-}) wurden bei Normalverteilung mittels t-Test auf Signifikanz getestet. Waren die Werte nicht normalverteilt, so wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test verwendet. Unterschiede mehrerer Versuchsgruppen zu einer Kontrollgruppe (Thapsigargin vs. Kontrolle) wurden bei Normalverteilung mittels One-Way ANOVA-Test und Dunn's-Post-Hoc-Test auf Signifikanz getestet. Waren die Werte nicht normalverteilt, so wurde der parameterfreie Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei einem p-Wert < 0,05 wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant angesehen (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). Alle Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) \pm Standardfehler („Standard Error of the Mean“ (SEM)) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Cuprizone-induzierte Schäden in WT und CHOP^{-/-} Mäusen

Hintergrund: In vorigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass CHOP^{-/-} Mäuse eine geringere Vulnerabilität gegenüber Cuprizone-induzierter Oligodendrozytenapoptose aufweisen. In WT Mäusen kann durch eine dreiwöchige Cuprizone-Intoxikation zuverlässig eine sub-maximale Demyelinisierung des Corpus callosum mit begleitender Mikrogliose und akutem axonalem Schaden induziert werden [38-40, 42].

Arbeitshypothese: Die durch CHOP-Deletion verminderte Oligodendrozytenapoptose führt zu verminderter Demyelinisierung, Mikrogliose und akutem axonalem Schaden.

Methoden: CHOP^{-/-} und WT Mäuse wurden über drei Wochen mit 0,25% Cuprizone gefüttert. Es wurde das mediale Corpus callosum in definierten Schnittregionen untersucht (s.Abb.21).

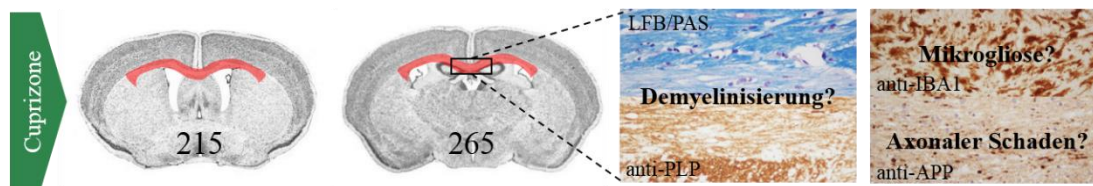


Abbildung 21: Untersuchungen im Cuprizone-Modell. Es wurde das mediale Corpus callosum in definierten Schnittregionen (215 und 265 nach [49]) untersucht. Das Ausmaß der Demyelinisierung wurde in LFB/PAS und anti-PLP gefärbten Schnitten quantifiziert. Das Ausmaß der Mikrogliose wurde in anti-IBA1 gefärbten Schnitten quantifiziert. Akuter axonaler Schaden wurde in anti-APP gefärbten Schnitten quantifiziert.

Ergebnisse: CHOP^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu WT Mäusen eine höhere Dichte an blau angefärbtem Myelin in LFB/PAS gefärbten Schnitten (s.Tab.32 und Abb.22-23). CHOP^{-/-} Mäuse zeigten zudem eine höhere Dichte an Myelin in anti-PLP gefärbten Schnitten (s.Tab.33 und Abb.24-25). CHOP^{-/-} Mäuse zeigten eine geringere Dichte an IBA1-positiven Zellen (s.Tab.34 und Abb.26-27). CHOP^{-/-} Mäuse zeigten eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden (s.Tab.35 und Abb.28-29). Zusammenfassend zeigte sich ein protektiver Effekt der CHOP-Deletion im Cuprizone-Modell.

Tabelle 32: Myelinisierung WT vs. CHOP^{-/-} (Cuprizone, LFB/PAS).

% Myelinisierung (LFB/PAS): MW (±SEM)		
	WT	CHOP ^{-/-}
Region 215	61,67 (±6,44)	85,42 (±2,63)
Region 265	47,92 (±6,87)	81,67 (±5,20)

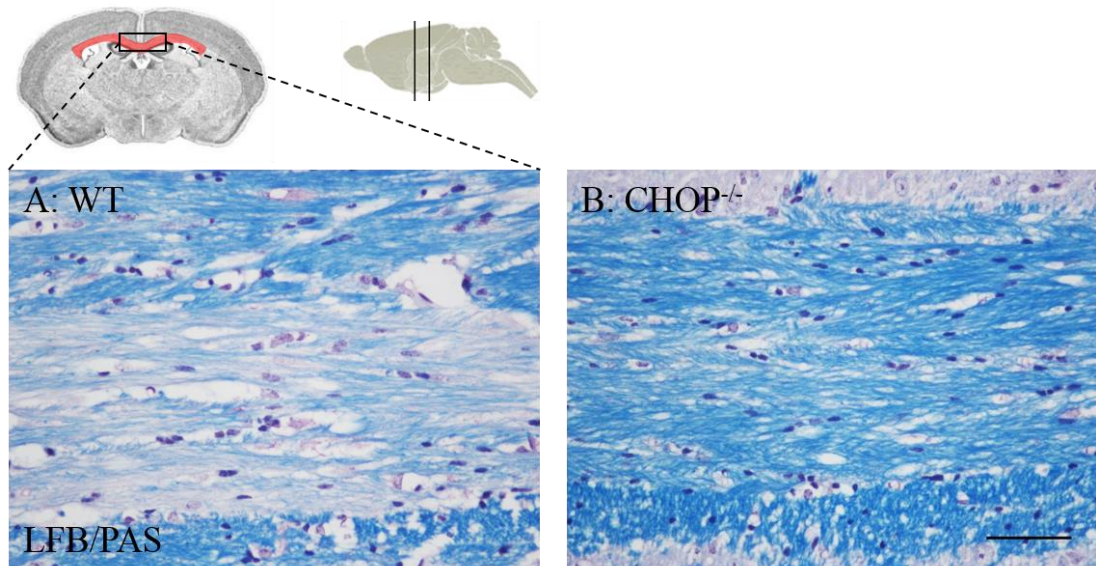


Abbildung 22: Demyelinisierung WT vs. CHOP^{-/-} (Cuprizone, LFB/PAS). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus in LFB/PAS Färbung; Maßstab=50 µm. Im Vergleich zu WT Mäusen (A) zeigten CHOP^{-/-} Mäuse (B) ein dichteres Netz an blau angefärbtem Myelin.

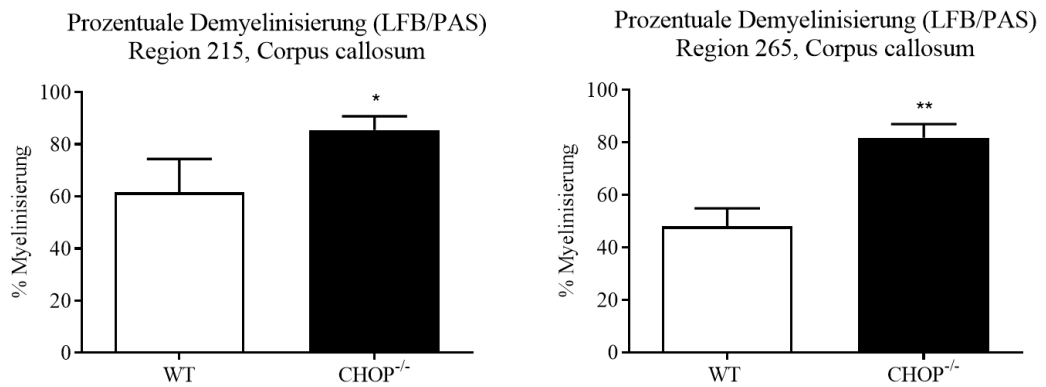


Abbildung 23: Ergebnis Demyelinisierung (Cuprizone, LFB/PAS). Beurteilt wurde das mediale Corpus callosum in den Regionen 215 und 265 (nach [49]). Im Vergleich zu WT Mäusen zeigten CHOP^{-/-} Mäuse einen prozentual höheren Anteil an Myelin. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des t-Tests auf statistische Signifikanz getestet.

Tabelle 33: Myelinisierung WT vs. *CHOP*^{-/-} (Cuprizone, anti-PLP).

% Myelinisierung (anti-PLP): MW (±SEM)		
	WT	<i>CHOP</i> ^{-/-}
Region 215	46,91 (±7,60)	73,43 (±0,94)
Region 265	56,54 (±7,76)	76,19 (±5,31)

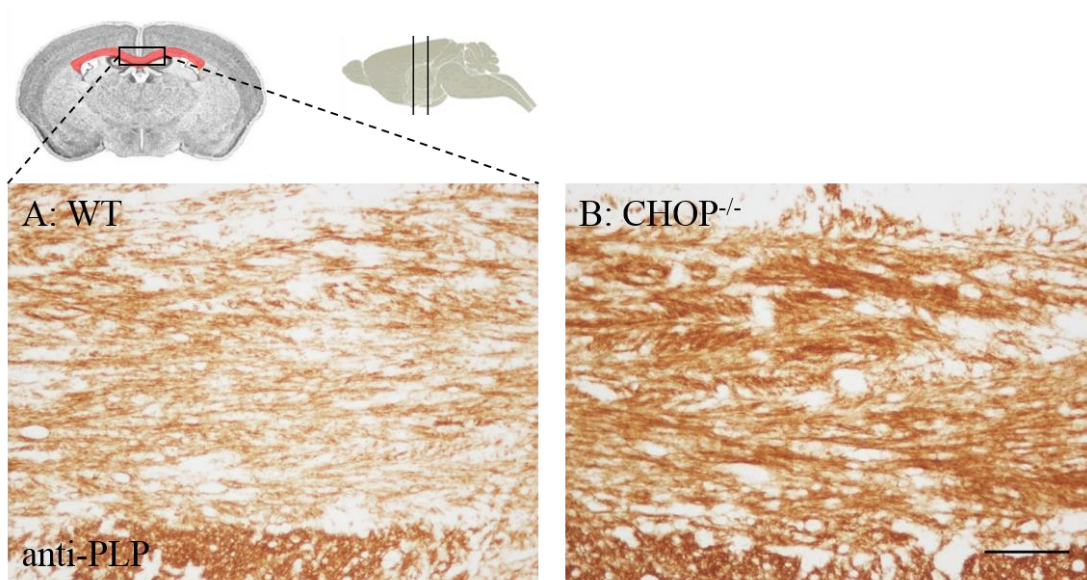


Abbildung 24: Demyelinisierung WT vs. *CHOP*^{-/-} (Cuprizone, anti-PLP). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus in anti-PLP Färbung; Maßstab=50 µm. Im Vergleich zu WT Mäusen (A) zeigten *CHOP*^{-/-} Mäuse (B) ein dichteres Netz an braun angefärbtem Myelin.

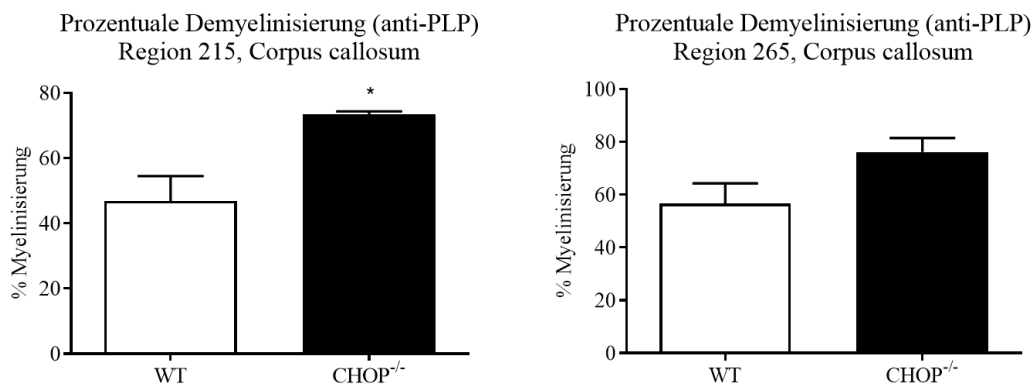


Abbildung 25: Ergebnis Demyelinisierung (Cuprizone, anti-PLP). Beurteilt wurde das mediale Corpus callosum in den Regionen 215 und 265 (nach [49]). Im Vergleich zu WT Mäusen zeigten *CHOP*^{-/-} Mäuse eine höhere Dichte an PLP-positivem Myelin. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des t-Tests auf statistische Signifikanz getestet.

Tabelle 34: Mikrogliose WT vs. *CHOP*^{-/-} (Cuprizone, anti-IBA1).

% Mikrogliose (anti-IBA1): MW (±SEM)		
	WT	<i>CHOP</i> ^{-/-}
Region 215	13,08 (±2,95)	4,92 (±0,47)
Region 265	21,15 (±3,18)	13,60 (±1,77)

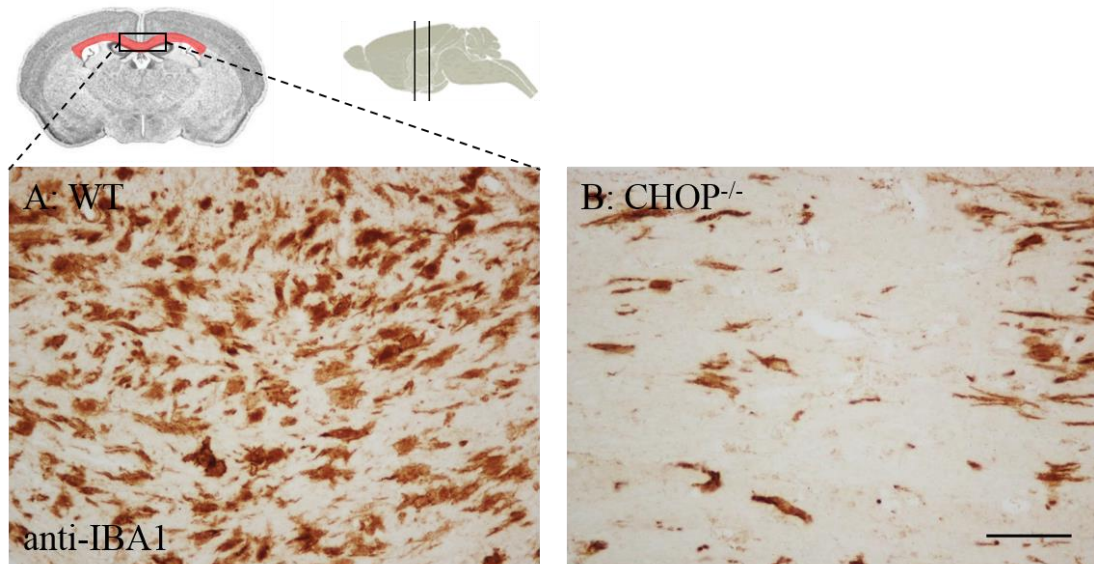


Abbildung 26: Mikrogliose WT vs. *CHOP*^{-/-} (Cuprizone, anti-IBA1). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus in anti-IBA1 Färbung; Maßstab=50 µm. Im Vergleich zu WT Mäusen (A) zeigten *CHOP*^{-/-} Mäuse (B) eine geringere Dichte an IBA1-positiven Mikrogliazellen.

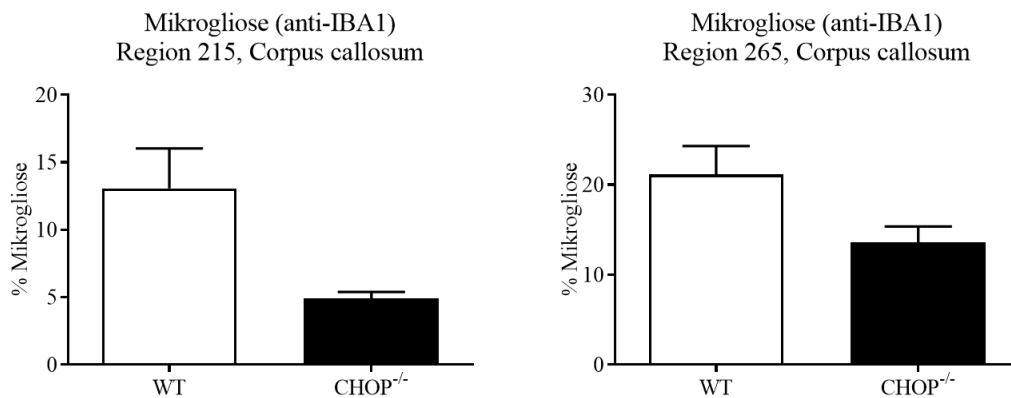


Abbildung 27: Ergebnis Mikrogliose (Cuprizone, anti-IBA1). Beurteilt wurde das mediale Corpus callosum in den Regionen 215 und 265 (nach [49]). Im Vergleich zu WT Mäusen zeigten *CHOP*^{-/-} Mäuse eine geringere Dichte an IBA1-positiven Zellen. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (Region 215) und des t-Tests (Region 265) auf statistische Signifikanz getestet.

Tabelle 35: Anzahl APP-Sphäroide WT vs. CHOP^{-/-} (Cuprizone, anti-APP).

APP-Sphäroide/mm ² (anti-APP): MW (±SEM)		
	WT	CHOP ^{-/-}
Region 265	2067,19 (±415,10)	954,67 (±501,10)

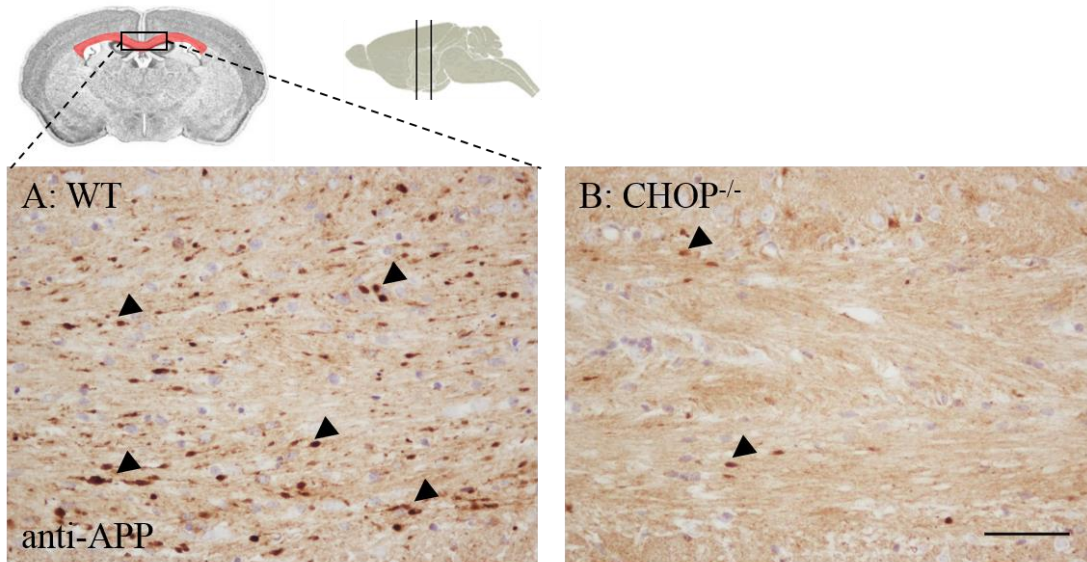


Abbildung 28: APP-Sphäroide WT vs. CHOP^{-/-} (Cuprizone, anti-APP). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus in anti-APP Färbung; Maßstab=50 µm. Im Vergleich zu WT Mäusen (A) zeigten CHOP^{-/-} Mäuse (B) eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden. Die Pfeilspitzen heben einige APP-Sphäroide hervor.

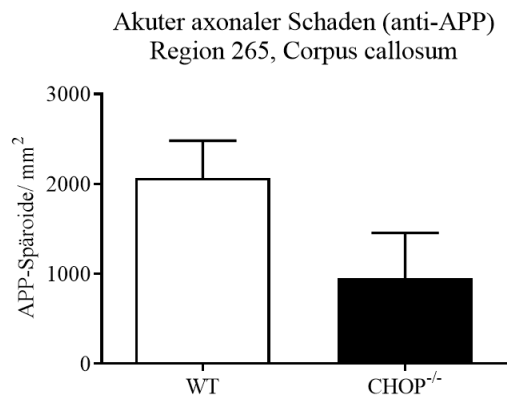


Abbildung 29: Ergebnis Anzahl APP-Sphäroide (Cuprizone, anti-APP). Beurteilt wurde das mediale Corpus callosum in Region 265 (nach [49]). Im Vergleich zu WT Mäusen zeigten CHOP^{-/-} Mäuse eine geringere Anzahl an APP-Sphäroiden. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des t-Tests auf statistische Signifikanz getestet.

Weiterführende Fragestellung: In den vorigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass CHOP nach Kurzzeit-Cuprizone-Intoxikation selektiv von Oligodendrozyten exprimiert wird. Nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation wäre auch eine CHOP-Expression durch andere Zelltypen möglich. Um die verminderte Cuprizone-induzierte Demyelinisierung, Mikrogliose und den verminderten akuten axonalen Schaden in CHOP^{-/-} Mäusen auf die verminderte initiale Oligodendrozytenapoptose zurückzuführen, muss eine CHOP-induzierte Apoptose anderer Zelltypen ausgeschlossen werden.

Arbeitshypothese: Oligodendrozyten weisen die höchste Vulnerabilität gegenüber CHOP-induzierter Apoptose auf.

Methoden: Um zu überprüfen, ob CHOP nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation exprimiert wird, wurden CHOP-positive Zellen in anti-CHOP gefärbten Schnitten ausgezählt. Die CHOP-Expression der Cuprizone-Gruppe (3 Wochen Cuprizone) wurde mit Kontrollmäusen (3 Wochen normales Futter) und einer Positivkontrolle (1 Woche Cuprizone) verglichen.

In der fluoreszierenden CHOP-OLIG2-Doppelfärbung wurde untersucht, ob es sich bei den CHOP-exprimierenden Zellen um Oligodendrozyten handelt. Von vier WT Mäusen (3 Wochen Cuprizone) wurde jeweils ein Schnitt der Region 265 untersucht.

Ergebnisse: Nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation konnte im Vergleich zu Kontrollmäusen eine erhöhte CHOP-Expression nachgewiesen werden, die jedoch geringer ausgeprägt war als nach einwöchiger Cuprizone-Intoxikation (s.Tab.36 und Abb.30). 87% der nukleär CHOP-exprimierenden Zellen waren Oligodendrozyten (s.Tab.37 und Abb.30-31).

Tabelle 36: Anzahl CHOP-positive Zellen Ko vs. 1W vs. 3W Cuprizone.

CHOP-positive Zellen/mm² (anti-CHOP): MW (±SEM)			
	Kontrolle	1 Woche Cuprizone	3 Wochen Cuprizone
Region 215	0,5 (±0,5)	630,42 (±68,03)	244,39 (±30,87)

Tabelle 37: Anzahl CHOP-OLIG2-positive Zellen (Cuprizone, Doppelfärbung).

CHOP+ (gesamt)	CHOP+/OLIG2+	CHOP+ (andere Zelltypen)
541	468	73

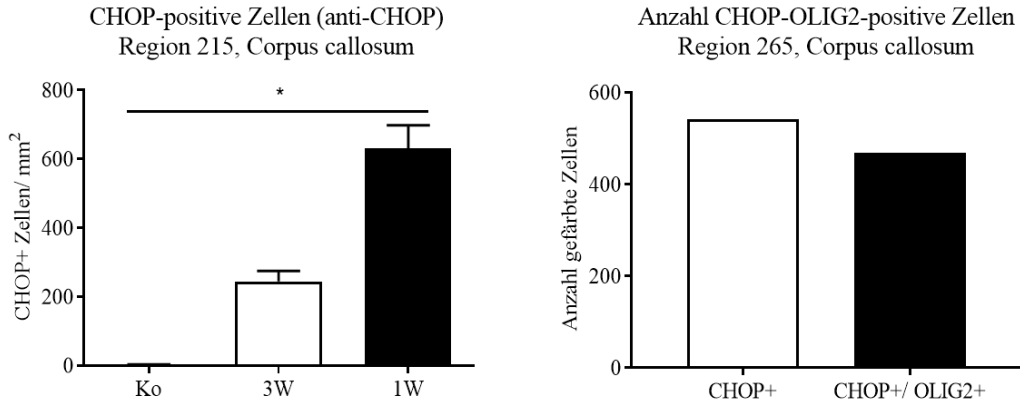


Abbildung 30: Ergebnis Anzahl CHOP-positive Zellen Ko vs. 1W vs. 3W. Linker Graph: Beurteilt wurde das mediale Corpus callosum in Region 215 (nach [49]). Im Vergleich zu Kontrollmäusen (Ko) zeigte sich nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation (3W) eine erhöhte Anzahl an CHOP-positiven Zellen, die jedoch geringer war als nach einwöchiger Cuprizone-Intoxikation (1W). Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und Dunn's-Post-Hoc-Test auf statistische Signifikanz getestet. Rechter Graph: Beurteilt wurde das mediale Corpus callosum in Region 265 (nach [49]). 87% der CHOP-positiven Zellen zeigten eine Ko-Lokalisation mit OLIG2 (3 Wochen Cuprizone).

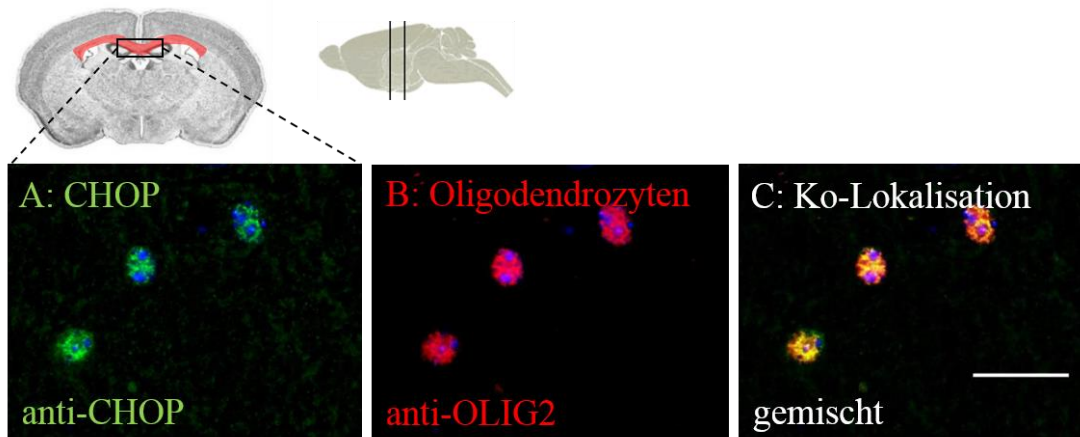


Abbildung 31: Repräsentatives Bild CHOP-OLIG2-Doppelfärbung. Gezeigt ist ein Ausschnitt des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus mit repräsentativen, doppel-fluoreszierenden Zellen. A: CHOP-positive Zellen (grün-fluoreszierend) zeigen in 87% eine Ko-Lokalisation mit B: OLIG2-positiven Zellen (rot-fluoreszierend). C: Ko-Lokalisation von CHOP und OLIG2; Maßstab=20 μ m.

3.2 Anzahl perivaskulärer Läsionen in WT und CHOP^{-/-} Mäusen

Hintergrund: Cuprizone-induzierte Neurodegeneration wurde als Auslöser der Rekrutierung peripherer Immunzellen ins Telencephalon beschrieben. Das Ausmaß der peripheren Immunzellrekrutierung kann durch die Anzahl an PVCs quantifiziert werden [47, 54]. Bisher wurde eine verminderte Vulnerabilität von CHOP^{-/-} Mäusen gegenüber Cuprizone-induzierten, neurointrinsic Schäden gezeigt.

Arbeitshypothese: Die durch CHOP-Deletion verminderte neurointrinsic Degeneration führt zu einer verminderten peripheren Immunzellrekrutierung ins Telencephalon.

Methoden: CHOP^{-/-} und WT Mäuse wurden über drei Wochen mit 0,25% Cuprizone gefüttert und anschließend mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert. Die Auszählung der telencephalen PVCs erfolgte manuell in HE und anti-IBA1 gefärbten Schnitten (s.Abb.32). Bei jedem Versuchstier wurden von Region 215 und 265 jeweils drei HE gefärbte Schnitte mit einem durchschnittlichen Abstand von 50 µm und ein anti-IBA1 gefärbter Schnitt untersucht.

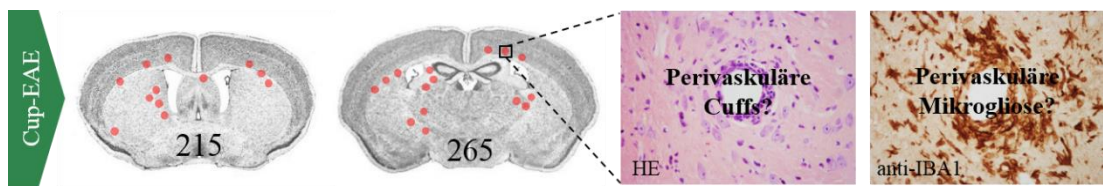


Abbildung 32: Untersuchungen im Cup-EAE-Modell. Die Anzahl und Verteilung von PVCs wurde in definierten Schnittregionen (215 und 265 nach [49]) manuell gezählt. Es wurden HE und anti-IBA1 gefärbte Schnitte untersucht.

Ergebnisse: Im Vergleich zu WT Mäusen zeigten CHOP^{-/-} Mäuse eine geringere Anzahl an PVCs in HE gefärbten Schnitten (s.Tab.38 und Abb.33-34). Zudem zeigten CHOP^{-/-} Mäuse eine geringere Anzahl an perivaskulärer Mikrogliose in anti-IBA1 gefärbten Schnitten (s.Tab.38 und Abb.35-36). Die PVCs waren topographisch weit verbreitet und im Corpus callosum, Kortex und subkortikal zu finden.

Tabelle 38: Anzahl PVCs WT vs. CHOP^{-/-} (Cup-EAE, HE und anti-IBA1).

	WT	CHOP ^{-/-}
Anzahl an PVCs (HE): MW (±SEM)		
Region 215	7,92 (±0,71)	5,46 (±0,97)
Region 265	5,92 (±0,46)	3,58 (±0,83)
Anzahl an PVCs (anti-IBA1): MW (±SEM)		
Region 215	6,87 (±1,88)	2,75 (±0,86)
Region 265	5,13 (±0,81)	2,38 (±0,32)

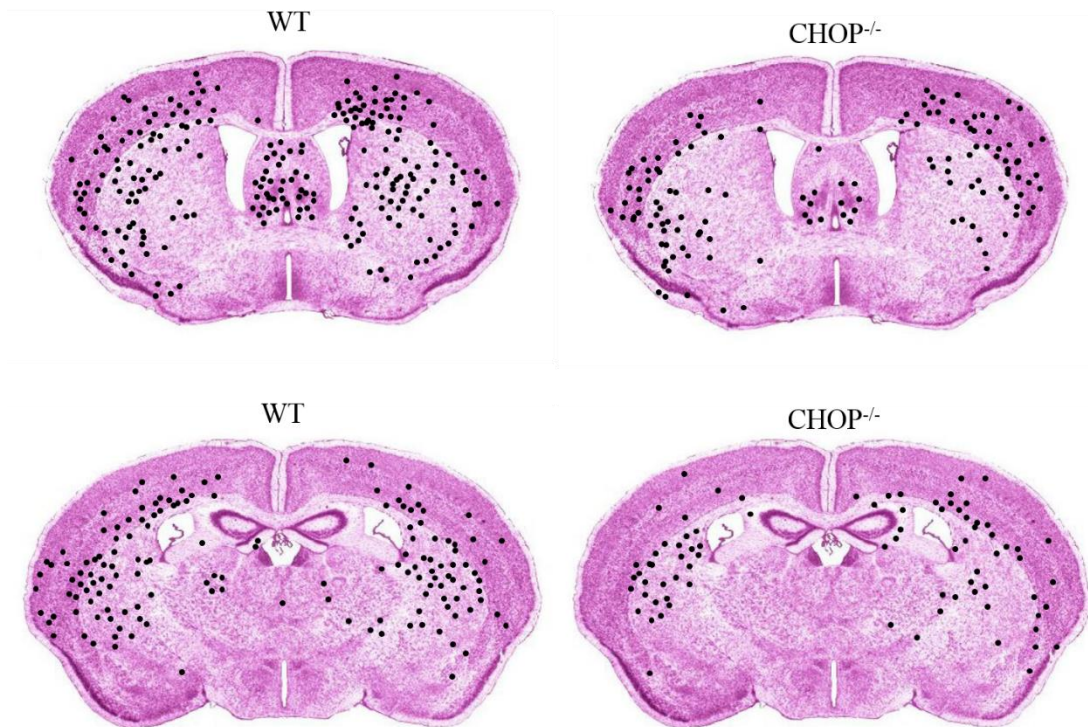


Abbildung 33: Kumulative Anzahl der PVCs (Cup-EAE, HE). Jeder schwarze Punkt repräsentiert einen PVC. Es wurden die Regionen 215 und 265 (nach [49]) untersucht. Jedes Schnittbild zeigt die kumulative Anzahl an PVCs von jeweils 24 Schnitten (8 Mäuse x 3 Schnitte). CHOP^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu WT Mäusen eine geringere Anzahl an PVCs.

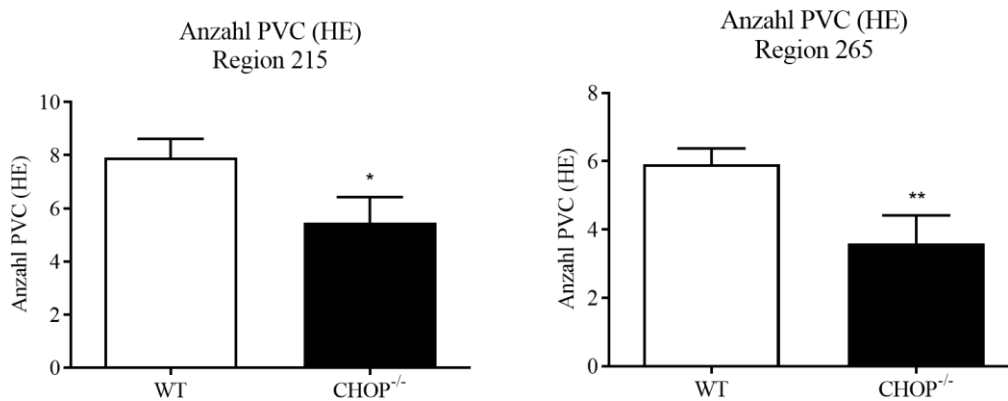


Abbildung 34: Ergebnisse PVC-Anzahl (Cup-EAE, HE). Es wurden die Regionen 215 und 265 (nach [49]) untersucht. CHOP^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu WT Mäusen eine geringere Anzahl an PVCs. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf statistische Signifikanz getestet.

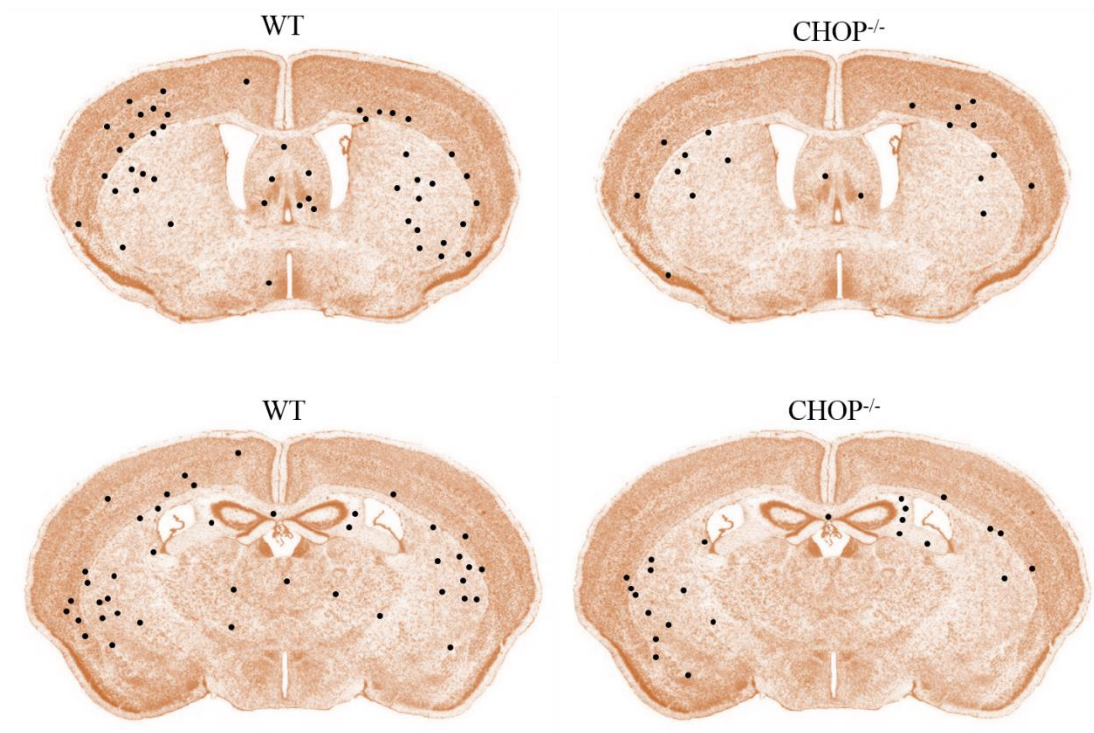


Abbildung 35: Kumulative Anzahl der PVCs (Cup-EAE, anti-IBA1). Jeder schwarze Punkt repräsentiert einen PVC. Es wurden die Regionen 215 und 265 (nach [49]) untersucht. Jedes Schnittbild zeigt die kumulative Anzahl an PVCs von jeweils 8 Schnitten (8 Mäuse x 1 Schnitt). CHOP^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu WT Mäusen eine geringere Anzahl an PVCs.

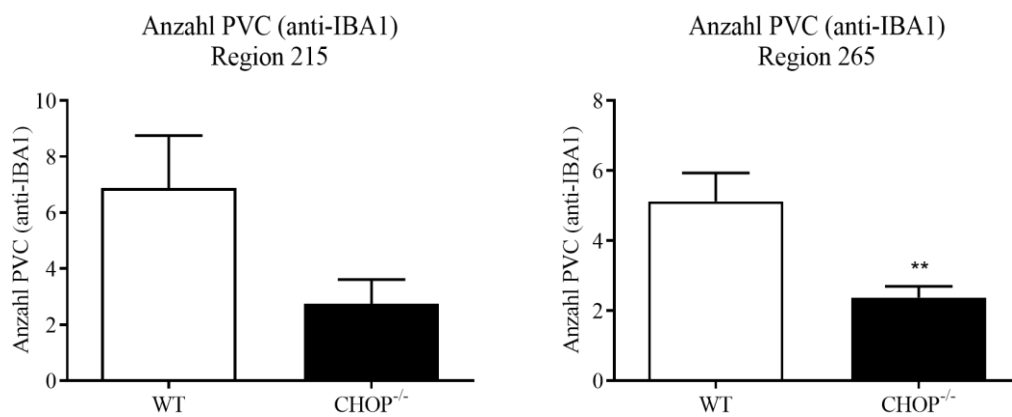


Abbildung 36: Ergebnisse PVC-Anzahl (Cup-EAE, anti-IBA1). Es wurden die Regionen 215 und 265 (nach [49]) untersucht. CHOP^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu WT Mäusen eine geringere Anzahl an PVCs. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des t-Tests auf statistische Signifikanz getestet.

3.3 EAE-induzierte Schäden in WT und CHOP^{-/-} Mäusen

Hintergrund: Bisher konnte ein protektiver Effekt der CHOP-Deletion im Cuprizone-Modell und eine geringere Anzahl an PVCs im Cup-EAE-Modell nachgewiesen werden. Ob die CHOP-Deletion auch zu einem verbesserten klinischen Verlauf im Cup-EAE-Modell führt, ist unklar. Würden CHOP^{-/-} Mäuse einen verbesserten klinischen Verlauf im Cup-EAE-Modell zeigen, so könnte davon ausgegangen werden, dass die verringerte Anzahl an PVCs im Telencephalon auf eine verminderte autoimmunne Reaktion zurückzuführen ist. Ob sich im reinen EAE-Modell ein protektiver Effekt der CHOP-Deletion zeigt und ob Immunzellen direkt durch die CHOP-Deletion beeinflusst werden, ist ebenso unklar.

Arbeitshypothese: Die CHOP-Deletion hat keinen Einfluss auf immunologisch vermittelte Schäden.

Methoden: WT und CHOP^{-/-} Mäuse wurden bezüglich der Immunantwort auf MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung im EAE und Cup-EAE-Modell verglichen. Es wurden die täglich erhobenen klinischen Scoring-Werte und die entzündliche Demyelinisierung des Rückenmarkes (LFB/PAS) verglichen (s.Abb.37). Im EAE und Cup-EAE-Modell ist ein ähnlicher klinischer Verlauf zu erwarten [47].

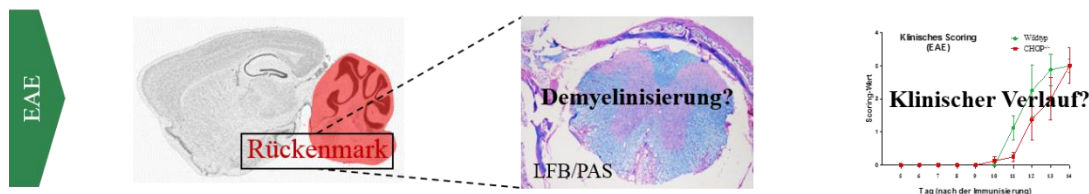


Abbildung 37: Untersuchungen im EAE-Modell. Es wurde der klinische Verlauf nach Immunisierung und die entzündliche Demyelinisierung des Rückenmarkes (LFB/PAS) untersucht.

Ergebnisse: Anhand der klinischen Scoring-Werte konnte in der EAE und im Cup-EAE-Modell kein signifikanter Unterschied zwischen WT und CHOP^{-/-} Mäusen bezüglich des Krankheitsbeginnes (Score >1), des maximalen Scores an Tag 14 und des kumulativen Scores festgestellt werden (s.Tab.39 und Abb.38). WT und CHOP^{-/-} Mäuse zeigten eine ähnlich schwere entzündliche Demyelinisierung des Rückenmarkes in LFB/PAS gefärbten Schnitten (s.Tab.39 und Abb.39).

Tabelle 39: Klinisches Scoring und Rückenmark-Demyelinisierung (EAE/ Cup-EAE).

	WT		CHOP ^{-/-}	
	EAE	Cup-EAE	EAE	Cup-EAE
Tag nach Immunisierung: MW (±SEM)				
Beginn (Score >1)	11,25 (±0,54)	12,50 (±0,25)	12,50 (±0,43)	12,00 (±2,08)
maximaler Score	3,00 (±0,18)	2,13 (±0,21)	3,00 (±0,47)	2,44 (±0,52)
kumulativer Score	9,25 (±1,55)	4,69 (±0,61)	6,75 (±1,74)	7,50 (±2,69)
Prozentuale Demyelinisierung des Rückenmarkes (LFB/PAS): MW (±SEM)				
%	13,55 (±2,90)	13,25 (±2,45)	11,25 (±1,10)	10,88 (±2,54)

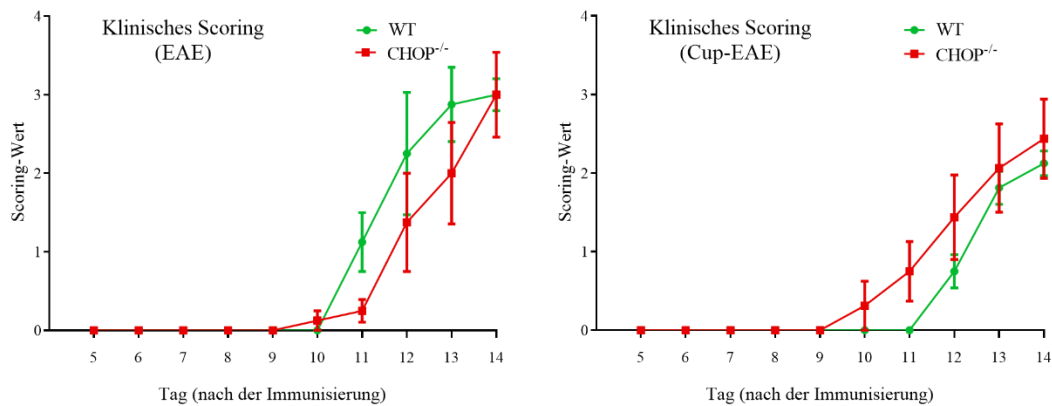


Abbildung 38: Klinischer Verlauf WT vs. CHOP^{-/-} (EAE und Cup-EAE). WT (grüne Kurven) und CHOP^{-/-} (rote Kurven) Mäuse zeigten in der EAE (links) und der Cup-EAE-Gruppe (rechts) klinisch einen ähnlich schweren Verlauf.

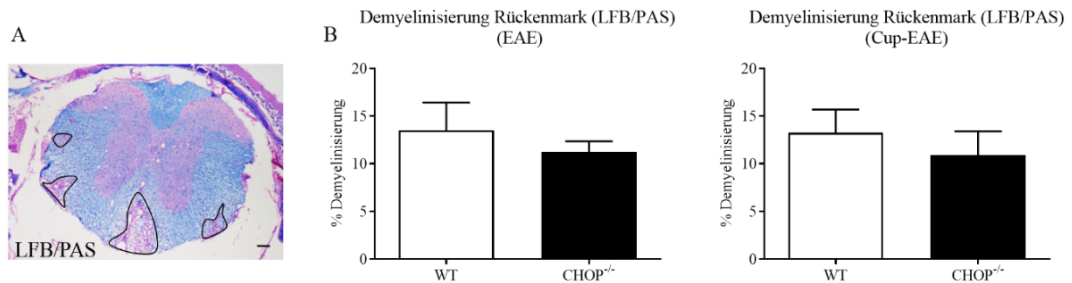


Abbildung 39: Demyelinisierung Rückenmark WT vs. CHOP^{-/-} (LFB/PAS). A: zeigt ein repräsentatives Bild eines Rückenmark Querschnittes in LFB/PAS Färbung; Maßstab=100 µm. Demyelinisierte Areale sind durch schwarze Umrandungen hervorgehoben. B: WT und CHOP^{-/-} Mäuse zeigten eine ähnlich ausgeprägte entzündliche Demyelinisierung des Rückenmarkes. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des t-Tests auf statistische Signifikanz getestet.

Weiterführende Fragestellung: Es wurden weitere Untersuchungen angeschlossen, um zu verifizieren, dass die CHOP-Deletion keinen direkten Einfluss auf Immunzellen hat.

Methoden: CHOP-positive Zellen wurden in anti-CHOP gefärbten Schnitten ausgezählt. Nach einwöchiger Cuprizone-Intoxikation kann in Gehirnen von WT Mäusen zuverlässig eine CHOP-Expression nachgewiesen werden (Positivkontrolle). Es wurden die Milzen von drei Kontroll-Mäusen und drei EAE-Mäusen auf das Vorhandensein CHOP-positiver Zellen untersucht. Die CHOP-Expression um PVCs wurde in Gehirnschnitten von Mäusen der Cup-EAE-Gruppe untersucht.

Ergebnisse: In den Milzen von Kontroll- und EAE-behandelten Mäusen konnten keine CHOP-positiven Zellen nachgewiesen werden. Um PVCs konnten in WT und CHOP^{-/-} Mäusen keine CHOP-positiven Zellen nachgewiesen werden (s.Abb.40).

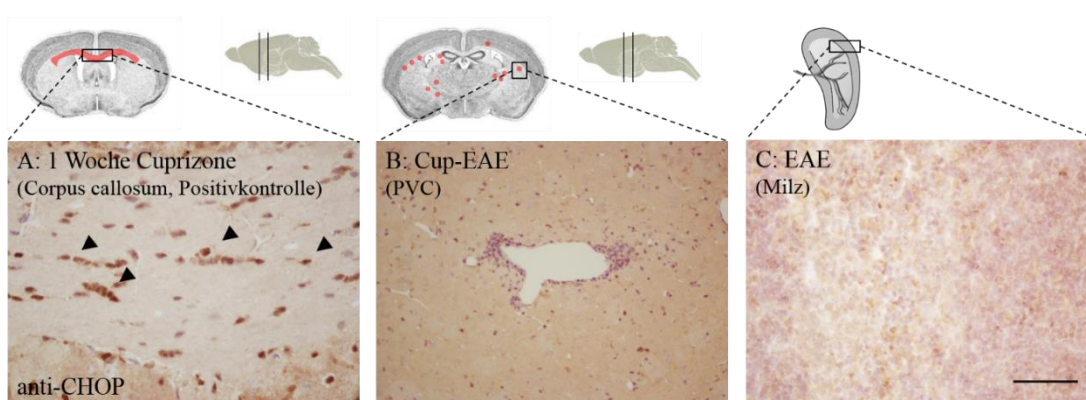


Abbildung 40: CHOP-Expression PVC (Cup-EAE) und Milz (EAE). A: Als Positivkontrolle dienten Gehirnschnitte von Mäusen nach einwöchiger Cuprizone-Intoxikation. Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt des medialen Corpus callosum auf Höhe des Zusammenschlusses der Commissura anterior. Die Pfeile markieren CHOP-positive Zellen. B: Um PVCs waren keine CHOP-positiven Zellen nachweisbar. Die basophil angefärbten Zellkerne der infiltrierenden Leukozyten waren gut erkennbar. C: In den Milzen waren weder bei Kontrollen, noch bei EAE-Mäusen CHOP-positive Zellen nachweisbar; Maßstab=50 µm.

3.4 Vergleich von diffusem und fokalem akutem axonalem Schaden

Hintergrund: Im Cup-EAE-Modell können zwei Arten von akutem axonalem Schaden unterschieden werden: diffuser, Cuprizone-induzierter Schaden und fokaler Schaden durch sekundär infiltrierende Immunzellen.

In den bisherigen Versuchen konnte ein protektiver Effekt der CHOP-Deletion im Cuprizone-Modell gezeigt werden. Analog dazu ist im Cup-EAE-Modell eine verminderte Vulnerabilität von CHOP^{-/-} Mäusen gegenüber diffusem, Cuprizone-induziertem Schaden zu erwarten.

In Umgebung der PVCs konnte keine CHOP-Expression nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass perivaskuläre Schäden CHOP-unabhängig entstehen. Die CHOP-Deletion dürfte also keinen Einfluss auf den perivaskulären axonalen Schaden haben.

Arbeitshypothese: Fokale, durch periphere Immunzellen induzierte Läsionen im Telencephalon sind durch die CHOP-Deletion unbeeinflusst.

Methoden: CHOP^{-/-} und WT Mäuse wurden über drei Wochen mit 0,25% Cuprizone gefüttert und anschließend mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert. Es wurde die Anzahl an APP-Sphäroiden in anti-APP gefärbten Schnitten quantifiziert. Es wurde der Cuprizone-induzierte, diffuse Schaden (im Corpus callosum) und der direkt durch infiltrierende Immunzellen verursachte fokale Schaden (um PVCs) verglichen (s.Abb.41).

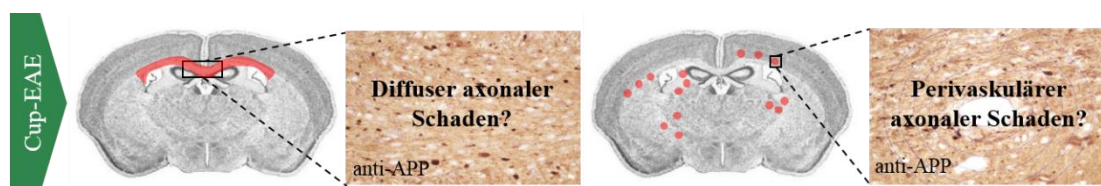


Abbildung 41: Untersuchung von diffusem und fokalem axonalem Schaden. Im Cup-EAE-Modell treten sowohl Cuprizone-induzierte, diffuse Schäden (untersucht im Corpus callosum) als auch fokale, durch infiltrierende Immunzellen induzierte Schäden (um PVCs) auf.

Ergebnisse: Im medialen Corpus callosum zeigte sich bei CHOP^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen eine signifikant geringere Anzahl an APP-Sphäroiden. Im Gegensatz dazu zeigten WT und CHOP^{-/-} Mäuse eine ähnliche Anzahl an perivaskulären APP-Sphäroiden. Die Anzahl an APP-Sphäroiden nahm mit zunehmendem Abstand zum PVC ab (s.Tab.40 und Abb.42).

Tabelle 40: Anzahl APP-Sphäroide/mm² fokal vs. diffus (anti-APP, Cup-EAE).

Anzahl APP-Sphäroide/ mm ² : MW (±SEM)		
Abstand zum Gefäß	WT	CHOP ^{-/-}
0-20 µm	232,54 (±84,89)	275,12 (±90,42)
20-40 µm	203,93 (±53,46)	167,96 (±69,70)
40-60 µm	78,97 (±21,05)	114,18 (±41,11)
60-80 µm	60,95 (±15,84)	90,33 (±25,37)
80-100 µm	29,10 (±6,53)	86,77 (±35,05)
Corpus callosum	193,87 (±9,20)	72,29 (±28,67)

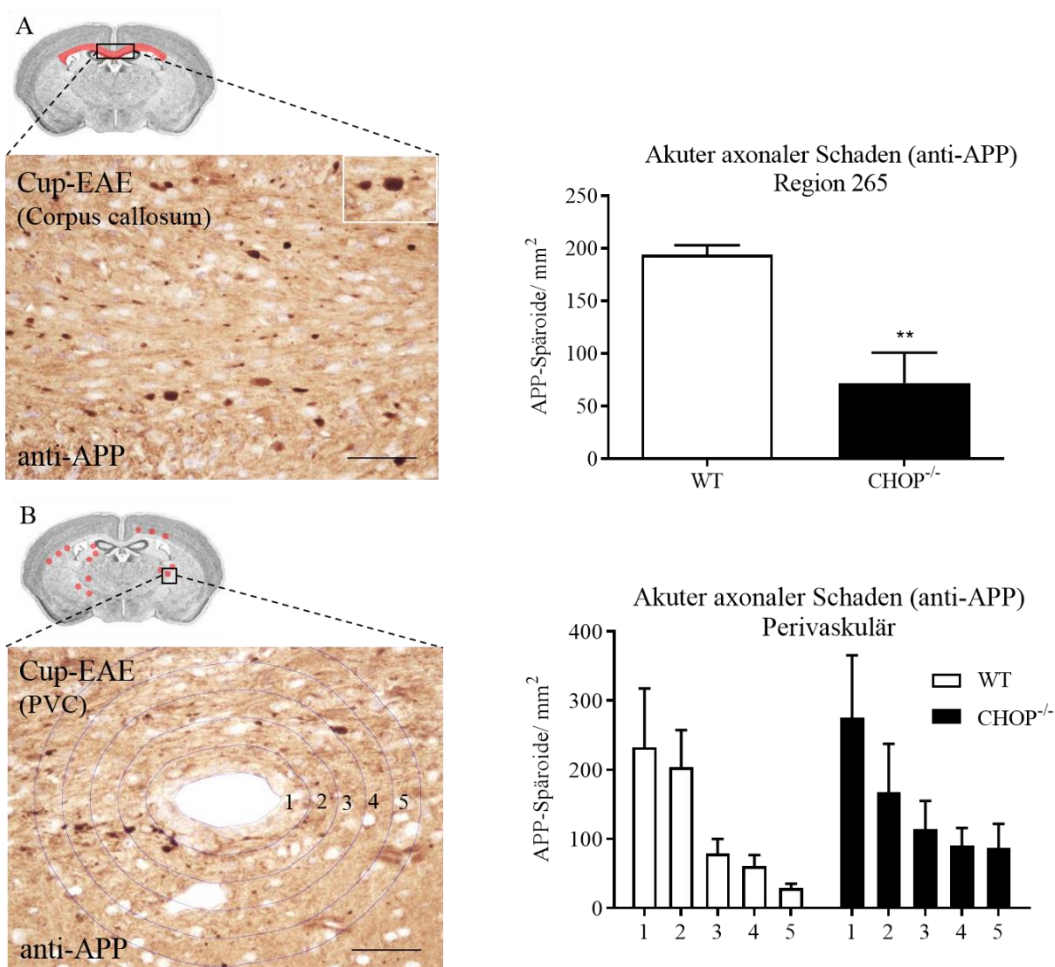


Abbildung 42: Ergebnisse diffuser vs. fokaler akuter axonaler Schaden, WT vs. CHOP^{-/-} (Cup-EAE, anti-APP). A: Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt des medialen Corpus callosum auf Höhe des rostralen Hippocampus; Maßstab=50 µm. Der Graph (rechts oben) zeigt die Anzahl der APP-Sphäroide im medialen Corpus callosum, welche in CHOP^{-/-} Mäusen geringer als in WT Mäusen war. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf statistische Signifikanz getestet. B: Gezeigt ist ein repräsentativer PVC in anti-APP Färbung; Maßstab=50 µm. Um PVCs zeigten CHOP^{-/-} und WT Mäuse eine ähnliche Anzahl und Verteilung der APP-Sphäroide. Die Anzahl der APP-Sphäroide nahm mit zunehmendem Abstand zum Gefäß ab (Abstände zum Gefäß: 1: 0-20 µm, 2: 20-40 µm, 3: 40-60 µm, 4: 60-80 µm, 5: 80-100 µm). Der Graph (rechts unten) veranschaulicht die Ergebnisse aus Tabelle 40, auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet.

3.5 Expression von P-eIF2 α in Oligodendrozyten

Hintergrund: Das Ausmaß der ER-Stress-Antwort in Oligodendrozyten soll *in vitro* anhand der Phosphorylierung von eIF2 α quantifiziert werden.

Arbeitshypothese: In Oligodendrozyten findet bei ER-Stress-Induktion eine Phosphorylierung von eIF2 α statt.

Methoden: Thapsigargin kann durch Hemmung der ER-ATPase in verschiedenen Zelllinien ER-Stress auslösen [55, 56]. Es wurden zwei Oligodendrozyten-Zelllinien (OLN93 und Oli-Neu) mit verschiedenen Thapsigargin-Konzentrationen behandelt. Der Nachweis von eIF2 α und P-eIF2 α erfolgte durch Western Blot. Die Auswertung erfolgte anhand der Dichte der gefärbten Banden (anti- β -Tubulin, anti-eIF2 α , anti-P-eIF2 α). Es wurde das Verhältnis von eIF2 α und P-eIF2 α zu β -Tubulin berechnet, um die Unterschiede der Gesamtproteinmenge der Proben (repräsentiert durch β -Tubulin) zu normieren. Das Verhältnis von P-eIF2 α / eIF2 α gibt den Anteil des phosphorylierten am gesamten eIF2 α an.

Ergebnisse: In der OLN93 Zelllinie zeigten Kontrollzellen im Vergleich zu Thapsigargin behandelten Zellen eine Verringerung des P-eIF2 α / β -Tubulin Verhältnisses. Abgesehen davon zeigten alle Versuchsgruppen ähnliche Ergebnisse (s.Tab.41-42 und Abb.43-44).

Tabelle 41: Dichtemessung eIF2 α und P-eIF2 α (Western Blot, OLN93).

OLN-93, Dichtemessung: MW (\pmSEM)			
	eIF2α / β-Tubulin	P-eIF2α / β-Tubulin	P-eIF2α / eIF2α
A	1,66 (\pm 0,34)	0,97 (\pm 0,07)	0,65 (\pm 0,18)
B	1,28 (\pm 0,04)	0,96 (\pm 0,07)	0,75 (\pm 0,04)
C	1,06 (\pm 0,12)	0,90 (\pm 0,05)	0,87 (\pm 0,05)
D	0,98 (\pm 0,04)	0,50 (\pm 0,14)	0,52 (\pm 0,15)

Tabelle 42: Dichtemessung eIF2 α und P-eIF2 α (Western Blot, Oli-Neu).

Oli-Neu, Dichtemessung: MW (\pmSEM)			
	eIF2α / β-Tubulin	P-eIF2α / β-Tubulin	P-eIF2α / eIF2α
A	1,01 (\pm 0,04)	0,86 (\pm 0,07)	0,86 (\pm 0,08)
B	0,96 (\pm 0,05)	0,93 (\pm 0,07)	0,97 (\pm 0,05)
C	0,97 (\pm 0,06)	1,11 (\pm 0,10)	1,15 (\pm 0,14)
D	0,87 (\pm 0,05)	0,89 (\pm 0,06)	1,03 (\pm 0,05)

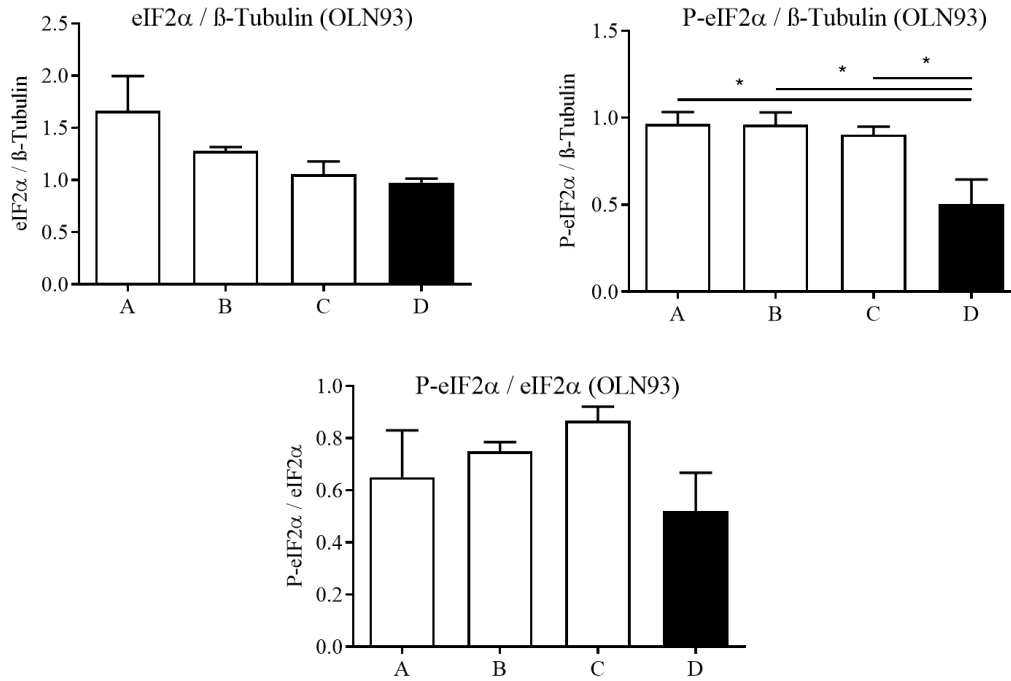


Abbildung 43: Ergebnisse Western Blot OLN93. Thapsigargin: A: 1200 nM, B: 600 nM, C: 300 nM, D: Kontrolle. Das eIF2 α / β -Tubulin Verhältnis war bei allen Gruppen ähnlich (oben links). Das P-eIF2 α / β -Tubulin Verhältnis war in Kontrollzellen geringer als in Thapsigargin behandelten Zellen (oben rechts). Das P-eIF2 α / eIF2 α Verhältnis war in allen Gruppen ähnlich (unten). Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way ANOVA-Tests und Dunn's-Post-Hoc-Test auf statistische Signifikanz getestet.

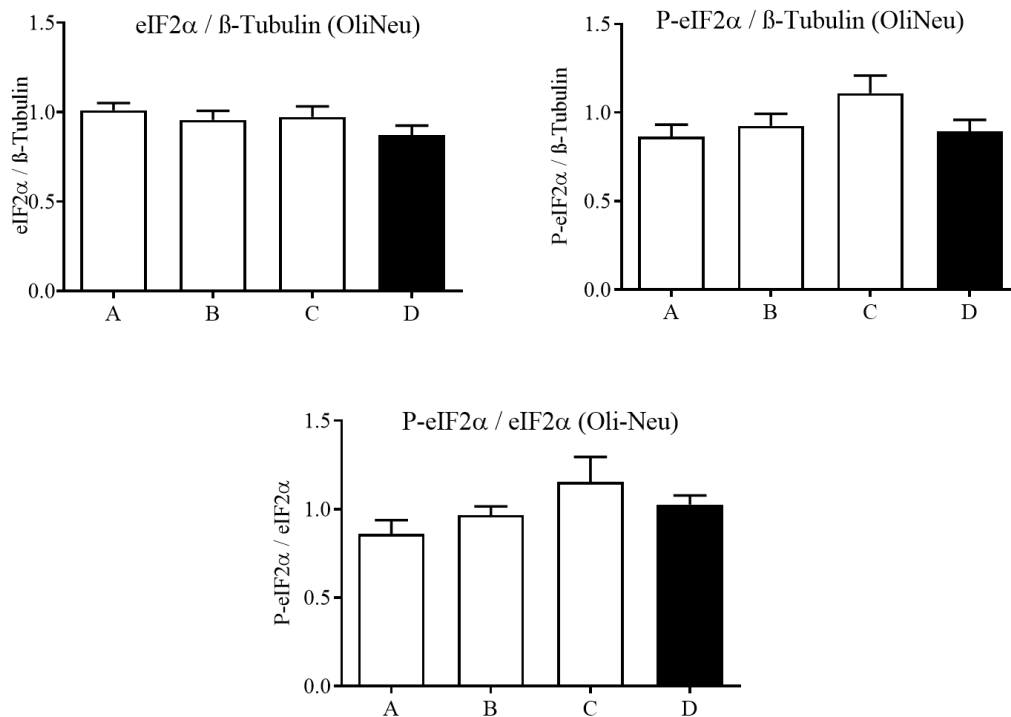


Abbildung 44: Ergebnisse Western Blot Oli-Neu. Thapsigargin: A: 1200 nM, B: 600 nM, C: 300 nM, D: Kontrolle. Die Verhältnisse von eIF2 α / β -Tubulin, P-eIF2 α / β -Tubulin und P-eIF2 α / eIF2 α waren in allen Versuchsgruppen ähnlich ausgeprägt. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) analysiert und mithilfe des One-Way ANOVA-Tests und Dunn's-Post-Hoc-Test auf statistische Signifikanz getestet.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

Es gibt kein Modell, welches die Komplexität von menschlichen MS-Läsionen komplett nachbilden kann. In den etablierten Mausmodellen können nur Teilaspekte der MS-Pathogenese untersucht werden. Vereinfacht kann eine Einteilung in autoimmune und neurodegenerative Aspekte vorgenommen werden. In den folgenden Abschnitten werden die Vorteile, Nachteile und Grenzen der Methoden diskutiert.

4.1.1 Mausmodelle

Das Cuprizone-Modell eignet sich gut, um primär neurodegenerative Prozesse, insbesondere die initiale Oligodendrozytenapoptose in frühen MS-Läsionen, zu untersuchen [6, 43]. Durch eine Cuprizone-Intoxikation kann zuverlässig eine Demyelinisierung des Corpus callosum induziert werden [38-40, 50, 57]. In der vorliegenden Studie konnte in WT Mäusen eine ausgeprägte Cuprizone-induzierte Demyelinisierung, Mikrogliose und akuter axonaler Schaden nachgewiesen werden. Die Reproduzierbarkeit von Cuprizone-induzierten Läsionen in WT Mäusen spricht für eine gute Versuchsdurchführung. Im Cuprizone-Modell können neurodegenerative Aspekte der MS unabhängig von autoimmunen Einflüssen untersucht werden. Das ist jedoch auch der Nachteil des Cuprizone-Modells: die immunologische Komponente der MS bleibt hierbei unbeachtet.

Die EAE eignet sich als immunologisches Modell gut zur Untersuchung akuter, inflammatorischer Schübe [44]. Sie ist jedoch keine progressive Erkrankung und eignet sich nicht zur Untersuchung von voranschreitenden, neurodegenerativen Prozessen. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die EAE hauptsächlich spinale und kaum die für MS-Patienten relevanten telencephalen Läsionen induziert werden [47].

Durch das Cuprizone-Modell und die EAE können neurodegenerative und autoimmune Teilaspekte der MS getrennt untersucht werden. Bei der Pathogenese der Erkrankung müssen jedoch beide Aspekte und deren Zusammenwirken berücksichtigt werden. Das von unserer Arbeitsgruppe neu entwickelte Cup-EAE-Modell hat den Vorteil, dass neurodegenerative und autoimmune Aspekte der MS parallel untersucht werden können. Im Cup-EAE-Modell wurde Neurodegeneration als potenter Trigger für periphere Immunzellrekrutierung beschrieben [47]. In der vorliegenden Studie konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.

In einer Studie von Locatelli et al. konnte durch die Induktion einer initialen Oligodendrozytenapoptose im Mausmodell keine Infiltration peripherer Immunzellen nachgewiesen werden [58]. Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick unseren Beobachtungen im Cup-EAE-Modell zu widersprechen. Der Unterschied der beiden Modelle ist, dass im Cup-EAE-Modell nicht nur die initiale Oligodendrozytenapoptose, sondern auch die Bildung autoreaktiver Immunzellen artifiziell induziert wird. Im Cup-EAE-Modell kann also nicht untersucht werden, ob durch die Oligodendrozytenapoptose autoimmune T-Zellen aktiviert werden. Es ist jedoch das erste Mausmodell, in welchem das Zusammenwirken von initialer Neurodegeneration und peripherer Immunzellrekrutierung sowie deren Einflussfaktoren untersucht werden können.

4.1.2 Zellkultur

Die Signalkaskaden der Oligodendrozytenapoptose können durch *in vitro* Experimente gezielt untersucht werden. Im vorliegenden Versuch konnte die Arbeitshypothese, dass in Oligodendrozyten durch ER-Stress eine Phosphorylierung von eIF2 α induziert wird, nicht verifiziert werden. Zwar zeigten Thapsigargin-behandelte Oligodendrozyten der OLN93-Zelllinie tendenziell eine höhere Expression von P-eIF2 α , ein signifikanter Unterschied zu Kontroll-Zellen war jedoch nicht erkennbar (s.Abb.43). Um eine erhöhte P-eIF2 α -Expression zu verifizieren, könnte in weiteren Versuchen die Arbeitshypothese an einer höheren Fallzahl getestet werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen neurointrinsischen, degenerativen Prozessen und peripherer Immunzellrekrutierung gezeigt werden. Der Transkriptionsfaktor CHOP wurde dabei als wichtiger Regulator identifiziert. Die homozygote CHOP-Deletion schützte Mäuse partiell vor Cuprizone-induzierter Demyelinisierung, Mikrogliose und akutem axonalem Schaden. Die verminderten neurointrinsischen Schäden führten nach Immunisierung der Mäuse zu einer verminderten sekundären peripheren Immunzellrekrutierung. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse unter Einbezug der aktuellen Literatur diskutiert.

4.2.1 CHOP-Deletion wirkt protektiv im Cuprizone-Modell

Nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation wurde CHOP überwiegend von Oligodendrozyten exprimiert (s.Abb.31). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass

Oligodendrozyten besonders vulnerabel für eine CHOP-Induktion sind. Eine durch CHOP-Deletion verminderte initiale Oligodendrozytenapoptose führte im Cuprizone-Modell zu verminderter Demyelinisierung, Mikrogliose und akutem axonalem Schaden (s.Abb.22-29).

Die Rolle der CHOP-induzierten Apoptose ist bei vielen Erkrankungen Gegenstand aktueller Forschung. CHOP^{-/-} Mäuse wurden in Modellen verschiedenster Erkrankungen untersucht, unter anderem bei renaler Dysfunktion [29], Diabetes mellitus [59], Ethanol-induzierten Lebererkrankungen [60], Kolitis [61] und Atherosklerose [62]. In vielen dieser Studien zeigte sich ein protektiver Effekt durch die CHOP-Deletion. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass CHOP eine pro-apoptotische Funktion in diesen Modellen ausübt. Weiterführend gibt es Hinweise auf eine CHOP-induzierte Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen, mitunter bei Morbus Parkinson [63] und Morbus Alzheimer [64].

Die Wirkung der CHOP-Deletion in demyelinisierenden Erkrankungen ist nicht widerspruchslös, teils sogar paradox (s.Tab.43). In einem Modell der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung verbesserte die CHOP-Deletion den Krankheitsverlauf und führte zu verminderter Demyelinisierung. CHOP scheint in diesem Kontext eine pro-apoptotische Wirkung zu haben [65]. Diese Beobachtungen sind widersprüchlich zu Ergebnissen in einem Modell der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung. Die CHOP-Deletion führte zu einem ausgeprägteren Krankheitsverlauf. CHOP scheint hier eine adaptive und anti-apoptotische Funktion zu erfüllen [66]. In der EAE wiederum zeigte die CHOP-Deletion keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf [67]. Diese Studien lassen eine Kontext-spezifische Funktion von CHOP in myelinisierenden Zellen vermuten.

Tabelle 43: Auswirkung der CHOP-Deletion und normale CHOP-Funktion in demyelinisierenden Erkrankungen.

Erkrankung	CHOP-Deletion	CHOP-Funktion	Quelle
MS (Cuprizone)	Verbesserung	pro-apoptotisch	Eigene Arbeit
MS (EAE)	keine Veränderung	unklar	[67]
Charcot-Marie-Tooth	Verbesserung	pro-apoptotisch	[65]
Pelizaeus-Merzbacher	Verschlimmerung	anti-apoptotisch	[66]

Indirekte Effekte könnten eine Erklärung für die paradoxe Wirkung der CHOP-Deletion sein. Die UPR ist ein komplexes Netzwerk, eine Blockade an einer Stelle kann zu Verschiebungen der anderen Signalkaskaden führen. Beispielsweise führt eine Blockade des PERK-Signalweges zu einer erhöhten IRE1-Aktivität [68]. Ebenso

könnte die CHOP-Deletion über Beeinflussung anderer UPR-Signalarmede zu Veränderungen führen. Ein Vergleich der anderen UPR-Signalmoleküle könnte helfen, die Kontext-spezifische Funktion von CHOP zu entschlüsseln.

In der vorliegenden Studie zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen CHOP^{-/-} und WT Mäusen, jedoch sollte die statistische Auswertung aufgrund der geringen Fallzahl kritisch betrachtet werden.

Eine weiterführende Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist: Verbessert die CHOP-Deletion auch die Remyelinisierungs-Fähigkeit der Oligodendrozyten? Eine CHOP-Expression ist nach einwöchiger, dreiwöchiger (s.Abb.30) und fünfwöchiger [69] Cuprizone-Intoxikation nachweisbar. Auch in gestressten, remyelinisierenden Oligodendrozyten konnten ER-Stress-Marker nachgewiesen werden [70]. Um den Einfluss der CHOP-Deletion auf die Remyelinisierung zu untersuchen, könnten weitere Versuche im Cuprizone-Modell angeschlossen werden. Die Untersuchung von Einflussfaktoren der Remyelinisierung ist wichtig, da eine verbesserte Remyelinisierung ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuer MS-Therapeutika ist.

4.2.2 CHOP-Deletion hat keinen Einfluss auf immunologische Schäden

Die CHOP-Deletion hatte keinen Einfluss auf den klinischen EAE-Verlauf (s.Abb.38). Im Cup-EAE-Modell war der direkt durch infiltrierende Immunzellen verursachte akute axonale Schaden von der CHOP-Deletion unbeeinflusst (s.Abb.42). In Milzen von EAE-behandelten Mäusen konnte keine CHOP-Expression nachgewiesen werden (s.Abb.40). Alle diese Ergebnisse lassen den Schluss zu: Immunzellen sind von CHOP unbeeinflusst und die CHOP-Deletion hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen.

Sowohl im Cuprizone-Modell (s.Abb.30-31) als auch im EAE-Modell [67] konnte eine CHOP-Expression nachgewiesen werden. Es erscheint zunächst widersprüchlich, dass die CHOP-Deletion nur im Cuprizone-Modell, nicht aber im EAE-Modell protektiv wirkt. Im Cuprizone-Modell führten wir den protektiven Effekt der CHOP-Deletion auf die verminderte initiale Oligodendrozytenapoptose zurück. Im EAE-Modell wird die entzündliche Demyelinisierung des Rückenmarkes jedoch auch direkt durch infiltrierende Leukozyten (welche von der CHOP-Deletion unbeeinflusst waren) induziert. Dies erklärt den fehlenden Einfluss der CHOP-Deletion auf den klinischen Verlauf der EAE. Schon in einer früheren Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass

die CHOP-Deletion keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der EAE hat [67]. Weiterführend wären histologische Untersuchungen des Rückenmarkes aufschlussreich. Wir untersuchten lediglich den Demyelinisierungsgrad des Rückenmarkes (s.Abb.39). Die gleich starke entzündliche Demyelinisierung in WT und CHOP^{-/-} Mäusen verifiziert den klinisch gleich schweren EAE-Verlauf. Mit dem aus dem Cuprizone-Modell gewonnenen Wissen, dass Oligodendrozyten besonders sensibel gegenüber CHOP-induzierter Apoptose sind, ergibt sich die Frage: Kann auch im EAE-Modell eine verminderte Oligodendrozytenapoptose durch CHOP-Deletion erreicht werden?

Akuter axonaler Schaden ist in Läsionen von verschiedenen MS-Mausmodellen nachweisbar [42]. In dieser Studie wurden durch den direkten Vergleich von diffusem (Cuprizone-induziertem) und fokalem akutem axonalem Schaden neue Informationen über die im Cup-EAE-Modell induzierten Läsionen gewonnen (s.Abb.41). Es konnte gezeigt werden, dass der fokale axonale Schaden um PVCs mit zunehmendem Abstand zum Gefäß abnahm. Dies indiziert einen direkt durch infiltrierende Immunzellen verursachten Schaden. Weiterführend zeigte sich durch die CHOP-Deletion eine Verbesserung des diffusen akuten axonalen Schadens, jedoch keine Verbesserung der Immunzell-induzierten Schäden.

Die EAE dient auch als Modell für die *Neuritis nervi optici*, eine häufige Erstmanifestation der MS. In einer Studie hierzu konnte gezeigt werden, dass bei der EAE eine Induktion von ER-Stress-Signalwegen in Neuronen stattfindet. Das Überleben von retinalen Ganglienzellen konnte durch die Inhibition des eIF2 α -CHOP-Signalweges und Aktivierung des IRE1-Signalweges verbessert werden [71]. In Einklang mit unseren Ergebnissen unterstreicht diese Studie die zentrale Rolle des ER-Stresses bei Neurodegeneration.

4.2.3 Verminderte Neurodegeneration und Immunzellrekrutierung

CHOP^{-/-} Mäuse zeigten eine verminderte Anzahl an PVCs (s.Abb.33-36). Da die Immunzellen selbst von der CHOP-Deletion unbeeinflusst waren, kann die verminderte Immunzellrekrutierung auf die initial verminderte Cuprizone-induzierte Neurodegeneration zurückgeführt werden. Dies ist die erste Studie, welche einen kausalen Zusammenhang zwischen verminderter neurointrinsiccher Degeneration und verminderter peripherer Immunzellrekrutierung belegen kann. Diese Ergebnisse

stärken die „Inside-Out“-Hypothese im Mausmodell [1, 72].

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Notwendigkeit neuroprotektiver Medikamente in der MS-Therapie. Eine verminderte Neurodegeneration und konsekutiv verminderte periphere Immunzellrekrutierung könnten gemeinsam die Progression der Erkrankung aufhalten. Neue therapeutische Strategien mit dem Ziel der Oligodendrozyten-Protektion könnten durch die Modulation von UPR-Signalwegen entwickelt werden. Einige Versuche von Lin et al. beschäftigten sich mit der protektiven Rolle des PERK-Signalweges in Oligodendrozyten. Eine Aktivierung des PERK-Signalweges führte zu einem verbesserten Überleben der Oligodendrozyten und einem milderen EAE-Verlauf [73, 74]. Die medikamentöse Aktivierung des PERK-Signalweges ist ein vielversprechender Angriffspunkt für neue MS-Therapeutika [75]. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen lassen sich zwei mögliche therapeutische Ziele der UPR-Modulation ableiten: Eine Unterstützung von adaptiven Signalwegen (PERK-Aktivierung) oder eine Hemmung von apoptotischen Prozessen (CHOP-Antagonisierung). Der PERK-CHOP-Signalweg kann sowohl adaptiv-protektiv als auch apoptotisch wirken, vermutlich abhängig von Dauer und Zeitpunkt des ER-Stresses [76]. Für eine gezielte therapeutische Manipulation der UPR muss das Zusammenspiel aller beteiligten Signalwege und Einflussfaktoren entschlüsselt werden. Inwiefern eine medikamentöse CHOP-Antagonisierung therapeutischen Wert besitzt, gilt es in weiterführenden Studien zu überprüfen.

Durch die vorliegende Studie konnte keine direkte Kausalität zwischen verminderter Oligodendrozytenapoptose und Immunzellrekrutierung belegt werden. Grundlegend beruhen die Experimente auf der These, dass Oligodendrozytenapoptose ein initiales Ereignis bei der Entstehung neuer MS-Läsionen ist [1, 5, 7]. Jedoch sind weder der Cuprizone-induzierte Schaden, noch die genetische CHOP-Deletion [29] Oligodendrozyten-spezifisch. In weiteren Studien könnte geprüft werden, ob eine verminderte Oligodendrozytenapoptose alleinig ausreicht, um eine verminderte periphere Immunzellrekrutierung zu erreichen. Dies wäre vorwiegend in Hinblick auf die MS-Pathogenese aufschlussreich. Die obig beschriebene klinische Relevanz der Oligodendrozyten-Protektion als potentiellen Angriffspunkt für neue Medikamente konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden.

4.2.4 ER-Stress in Oligodendrozyten

ER-Stress wurde als mögliche Ursache initialer Oligodendrozytenapoptose in MS-Läsionen identifiziert [8-10, 77]. Es ist unklar, durch welche Signalwege die Apoptose vermittelt wird. Die ISR kann in Oligodendrozyten experimentell durch verschiedene Stressoren aktiviert werden. In gestressten Oligodendrozyten konnte unter anderem eine im Vergleich zu Kontrollzellen erhöhte Expression von CHOP (auf RNA-Ebene), P-eIF2 α und phosphoryliertem PERK nachgewiesen werden [69]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir analog zu diesen Ergebnissen eine Tendenz zu einer erhöhten Expression von P-eIF2 α in gestressten Oligodendrozyten nachweisen. Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil des phosphorylierten am gesamten eIF2 α . Eine Erklärung, warum im vorliegenden Versuch keine erhöhte Expression von P-eIF2 α nachgewiesen werden konnte, ist: Durch die Thapsigargin-Behandlung kam es insgesamt zu einer erhöhten eIF2 α -Expression, der phosphorylierte Anteil am gesamten eIF2 α stieg jedoch nicht an.

Auch in der EAE konnte eine erhöhte Expression von P-eIF2 α in Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Es ist jedoch unklar, über welche eIF2 α -Kinase die Phosphorylierung vermittelt wurde [78]. Ein Problem bei der Bestimmung von P-eIF2 α ist, dass es ein sehr unspezifischer Marker ist. Eine Phosphorylierung von eIF2 α kann nicht nur durch ER-Stress, sondern eine Vielzahl an anderen Stressoren induziert werden [79]. Des Weiteren ist P-eIF2 α kein spezifischer UPR-Marker, sondern ein unspezifisches Produkt der ISR. Die Phosphorylierung von eIF2 α kann nicht nur durch PERK [15], sondern auch durch andere eIF2 α -Kinasen induziert werden [17-20]. Es sollte untersucht werden, über welche der Kinasen die Phosphorylierung von eIF2 α in der EAE und *in vitro* induziert wird.

Die Bestimmung einzelner Signalmoleküle der UPR ist in ihrer Aussagekraft beschränkt. Die vorliegende Arbeit leistet jedoch einen Beitrag, die komplexen UPR-Signalkaskaden in Oligodendrozyten zu entschlüsseln.

4.2.5 Abschließende Bemerkung

Bisher gab es keine klinische Studie, die einen positiven Effekt von Medikamenten in progressiven MS-Patienten zeigen konnte.

Vor kurzem konnte erstmals ein protektiver Effekt von Siponimod, einem Inhibitor des Sphingosin1-Phosphat-Rezeptors, in Patienten mit sekundär progressiver MS

nachgewiesen werden [36]. In einer multizentrischen, klinischen Studie wurden Patienten mit sekundär-progressiver MS untersucht. Die mit Siponimod behandelten Patienten zeigten im Vergleich zu Placebo-behandelten Patienten eine geringere Krankheitsprogression und eine geringere Gehirnatrophie in der Magnetresonanztomographie. Diese Neuroprotektion war von einer geringeren inflammatorischen Aktivität begleitet. Es ist zu vermuten, dass eine verminderte primäre Neurodegeneration (Sphingosin1-Phosphat Rezeptoren werden auch im Gehirn exprimiert) sekundär zu einer verminderten Rekrutierung von Immunzellen führt.

Diese Studie verdeutlicht den großen Nutzen neuroprotektiver Medikamente in der MS-Therapie. Inwiefern eine medikamentöse CHOP-Inhibition (beispielsweise ein CHOP-Antagonist) ähnliche oder sogar bessere Effekte entfalten könnte, bleibt abzuwarten. Die vorliegende Arbeit liefert jedoch gute Argumente dafür, diesen Signalweg speziell in Oligodendrozyten genauer zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Grundlegend basiert diese Arbeit auf der Hypothese, dass MS eine primär neurodegenerative Erkrankung ist und es sekundär zu einer Infiltration peripherer Immunzellen kommt. Ein mögliches initiales neurodegeneratives Ereignis ist eine ER-Stress-induzierte Oligodendrozytenapoptose. CHOP ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die ER-Stress-induzierte Apoptose vermittelt. CHOP wurde in menschlichen MS-Läsionen und den etablierten MS-Mausmodellen EAE und Cuprizone-Modell nachgewiesen. Die Rolle von CHOP bei der Oligodendrozytenapoptose und zugrundeliegende Signalkaskaden sind unklar.

Wichtigste Arbeitshypothese: Die homozygote Deletion des CHOP-Gens führt zu verminderter neurointrinsiccher Degeneration und konsekutiv zu verminderter peripherer Immunzellrekrutierung.

Methoden: Es wurden WT und CHOP^{-/-} Mäuse in verschiedenen MS-Mausmodellen verglichen. Die Gehirne der Versuchstiere wurden histologisch untersucht. Es wurde die neuro-intrinsische Degeneration (Cuprizone-Modell), die Anzahl an telencephalen perivaskulären Läsionen (Cup-EAE-Modell) und die Immunantwort (EAE-Modell) verglichen.

Ergebnisse: CHOP^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu WT Mäusen eine verminderte Vulnerabilität gegenüber Cuprizone-induzierten Schäden. CHOP^{-/-} Mäuse zeigten eine geringere Anzahl an telencephalen, perivaskulären Läsionen. CHOP^{-/-} und WT Mäuse zeigten eine ähnliche Immunantwort. Diese Ergebnisse zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen verminderter neuro-intrinsischer Degeneration und verminderter peripherer Immunzellrekrutierung.

Ausblick: Durch diese Studie wird vor allem der potentielle Nutzen neuroprotektiver Medikamente in der MS-Therapie deutlich: ein Schutz vor initialer Neurodegeneration könnte auch zu einer verminderten Immunzellrekrutierung führen. Die Modulation von ER-Stress-Kaskaden ist dabei ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt. Um die Manipulation der ER-Stress-Signalkaskaden therapeutisch zu nutzen, ist ein detailliertes Verständnis der zugrundeliegenden, neurodegenerativen Mechanismen essentiell.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypothesen der MS-Pathogenese.	- 7 -
Abbildung 2: Die „Unfolded Protein Response“ (UPR).....	- 8 -
Abbildung 3: PERK-Signalweg.	- 9 -
Abbildung 4: Cuprizone-Modell.	- 12 -
Abbildung 5: EAE-Modell.	- 12 -
Abbildung 6: Cup-EAE-Modell.	- 12 -
Abbildung 7: Versuchsgruppen Mausmodell.....	- 17 -
Abbildung 8: Skizze der Paraffinblöcke.	- 20 -
Abbildung 9: Regionen 215 und 265 (Mäuse-Gehirn-Atlas von Sidman et al.)... -	20 -
Abbildung 10: Farbe-Ergebnisse der LFB/PAS Färbung.	- 22 -
Abbildung 11: Färbeprinzip der Immunhistochemie.	- 23 -
Abbildung 12: Prinzip der fluoreszierenden Doppelfärbung.	- 25 -
Abbildung 13: Berechnung der Proteinkonzentration (Bradford-Assay).	- 29 -
Abbildung 14: Aufbau einer Elektrophorese-Kammer.	- 31 -
Abbildung 15: Aufbau des Blotting-Sandwich.	- 32 -
Abbildung 16: Skizze der Western Blot Membran.	- 33 -
Abbildung 17: Demyelinisierungsgrade des Corpus callosum (LFB/PAS).....	- 34 -
Abbildung 18: Auszählen von APP-Sphäroiden und CHOP-positiven Zellen.	- 36 -
Abbildung 19: Quantifizierung der Rückenmark-Demyelinisierung (LFB/PAS). -	37 -
Abbildung 20: Histologische Charakteristika perivaskulärer Infiltrate.	- 37 -
Abbildung 21: Untersuchungen im Cuprizone-Modell.....	- 40 -
Abbildung 22: Demyelinisierung WT vs. CHOP ^{-/-} (Cuprizone, LFB/PAS).....	- 41 -
Abbildung 23: Ergebnis Demyelinisierung (Cuprizone, LFB/PAS).....	- 41 -
Abbildung 24: Demyelinisierung WT vs. CHOP ^{-/-} (Cuprizone, anti-PLP).	- 42 -
Abbildung 25: Ergebnis Demyelinisierung (Cuprizone, anti-PLP).	- 42 -
Abbildung 26: Mikrogliose WT vs. CHOP ^{-/-} (Cuprizone, anti-IBA1).....	- 43 -

Abbildung 27: Ergebnis Mikrogliose (Cuprizone, anti-IBA1).....	- 43 -
Abbildung 28: APP-Sphäroide WT vs. CHOP ^{-/-} (Cuprizone, anti-APP).....	- 44 -
Abbildung 29: Ergebnis Anzahl APP-Sphäroide (Cuprizone, anti-APP).....	- 44 -
Abbildung 30: Ergebnis Anzahl CHOP-positive Zellen Ko vs. 1W vs. 3W.	- 46 -
Abbildung 31: Repräsentatives Bild CHOP-OLIG2-Doppelfärbung.	- 46 -
Abbildung 32: Untersuchungen in Cup-EAE-Modell.	- 47 -
Abbildung 33: Kumulative Anzahl der PVCs (Cup-EAE, HE).....	- 48 -
Abbildung 34: Ergebnisse PVC-Anzahl (Cup-EAE, HE).	- 48 -
Abbildung 35: Kumulative Anzahl der PVCs (Cup-EAE, anti-IBA1).....	- 49 -
Abbildung 36: Ergebnisse PVC-Anzahl (Cup-EAE, anti-IBA1).....	- 49 -
Abbildung 37: Untersuchungen im EAE-Modell.	- 50 -
Abbildung 38: Klinischer Verlauf WT vs. CHOP ^{-/-} (EAE und Cup-EAE).	- 51 -
Abbildung 39: Demyelinisierung Rückenmark WT vs. CHOP ^{-/-} (LFB/PAS).....	- 51 -
Abbildung 40: CHOP-Expression PVC (Cup-EAE) und Milz (EAE).	- 52 -
Abbildung 41: Untersuchung von diffusem und fokalem axonalem Schaden.....	- 53 -
Abbildung 42: Ergebnisse diffuser vs. fokaler akuter axonaler Schaden, WT vs. CHOP ^{-/-} (Cup-EAE, anti-APP).	- 54 -
Abbildung 43: Ergebnisse Western Blot OLN93.....	- 56 -
Abbildung 44: Ergebnisse Western Blot Oli-Neu.....	- 56 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Materialien.	- 14 -
Tabelle 2: Klinische Beurteilung der Mäuse.	- 18 -
Tabelle 3: Herstellung der Perfusionslösung.	- 19 -
Tabelle 4: EDTA-Lösung.	- 19 -
Tabelle 5: Paraffineinbettung.	- 19 -
Tabelle 6: Entparaffinieren und Eindecken.	- 20 -
Tabelle 7: Färbeprotokoll HE.	- 21 -
Tabelle 8: Färbeprotokoll LFB/PAS.	- 22 -
Tabelle 9: PBS und Tris-EDTA-Puffer für IHC.	- 23 -
Tabelle 10: Blockierungs- und Verdünnungs-Lösungen für IHC.	- 24 -
Tabelle 11: Färbeprotokoll IHC.	- 24 -
Tabelle 12: Antikörper IHC.	- 24 -
Tabelle 13: Blockierungs- und Verdünnungs-Lösungen für IF.	- 25 -
Tabelle 14: Färbeprotokoll IF.	- 26 -
Tabelle 15: Antikörper IF.	- 26 -
Tabelle 16: PDL-Lösung und Sato-Medium Zellkultur.	- 27 -
Tabelle 17: Kultivierungs- und Experimentalmedien Zellkultur.	- 27 -
Tabelle 18: Thapsigargin-Verdünnungsreihe.	- 28 -
Tabelle 19: Versuchsgruppen der Thapsigargin-Behandlung.	- 28 -
Tabelle 20: BSA-Standard Bradford Assay.	- 29 -
Tabelle 21: Puffer für Elektrophorese-Gele.	- 30 -
Tabelle 22: Trenn- und Sammelgel.	- 30 -
Tabelle 23: Laemmli-Puffer.	- 31 -
Tabelle 24: Puffer für Western Blot.	- 31 -
Tabelle 25: Lösungen für Coomassie Blau und Ponceau S Färbung.	- 32 -
Tabelle 26: TBS und TBST Stocklösungen.	- 32 -

Tabelle 27: Färbeprotokoll Western Blot Membran.	- 33 -
Tabelle 28: Antikörper Western Blot.	- 33 -
Tabelle 29: Beurteilung der Demyelinisierung (LFB/PAS).	- 34 -
Tabelle 30: Arbeitsschritte der Dichte-Auswertung (ImageJ).	- 35 -
Tabelle 31: Arbeitsschritte der Western Blot Auswertung (ImageJ).	- 38 -
Tabelle 32: Myelinisierung WT vs. CHOP ^{-/-} (Cuprizone, LFB/PAS).	- 41 -
Tabelle 33: Myelinisierung WT vs. CHOP ^{-/-} (Cuprizone, anti-PLP).	- 42 -
Tabelle 34: Mikrogliose WT vs. CHOP ^{-/-} (Cuprizone, anti-IBA1).	- 43 -
Tabelle 35: Anzahl APP-Sphäroide WT vs. CHOP ^{-/-} (Cuprizone, anti-APP).	- 44 -
Tabelle 36: Anzahl CHOP-positive Zellen Ko vs. 1W vs. 3W Cuprizone.	- 45 -
Tabelle 37: Anzahl CHOP-OLIG2-positive Zellen (Cuprizone, Doppelfärbung).	- 45 -
Tabelle 38: Anzahl PVCs WT vs. CHOP ^{-/-} (Cup-EAE, HE und anti-IBA1).	- 47 -
Tabelle 39: Klinisches Scoring und Rückenmark-Demyelinisierung (EAE/ Cup-EAE).	- 51 -
Tabelle 40: Anzahl APP-Sphäroide/mm ² fokal vs. diffus (anti-APP, Cup-EAE).	- 54 -
Tabelle 41: Dichtemessung eIF2 α und P-eIF2 α (Western Blot, OLN93).	- 55 -
Tabelle 42: Dichtemessung eIF2 α und P-eIF2 α (Western Blot, Oli-Neu).	- 55 -
Tabelle 43: Auswirkung der CHOP-Deletion und normale CHOP-Funktion in demyelinisierenden Erkrankungen.	- 59 -

Literaturverzeichnis

1. Stys, P., et al., *Will the real multiple sclerosis please stand up?* Nature Reviews Neuroscience, 2012. **13**(7): p. 507-14.
2. Lucchinetti, C., et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.* Annals of Neurology, 2000. **47**(6): p. 707-17.
3. Kutzelnigg, A., et al., *Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis.* Brain Pathology, 2005. **128**(11): p. 2705-12.
4. Seewann, A., et al., *Diffusely abnormal white matter in chronic multiple sclerosis: imaging and histopathologic analysis.* Arch Neurol., 2009. **66**(5): p. 601-609.
5. Henderson, A., et al., *Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions.* Annals of Neurology, 2009. **66**(6): p. 739-53.
6. Rodriguez, M. and B. Scheithauer, *Ultrastructure of Multiple Sclerosis.* Ultrastructural Pathology, 1994. **18**(1-2): p. 3-13.
7. Barnett, M. and J. Prineas, *Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion.* Annals of Neurology, 2004. **55**(4): p. 458-68.
8. Cunnea, P., et al., *Expression profiles of endoplasmic reticulum stress-related molecules in demyelinating lesions and multiple sclerosis.* Multiple Sclerosis Journal, 2011. **17**(7): p. 808-818
9. Mháille, A., et al., *Increased Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Signaling Pathway Molecules in Multiple Sclerosis Lesions.* Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2008. **67**(3): p. 200-11.
10. McMahon, J., et al., *Increased expression of ER stress- and hypoxia-associated molecules in grey matter lesions in multiple sclerosis.* Multiple Sclerosis Journal, 2012. **18**(10): p. 1437-1447
11. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(7): p. 519-29.
12. Kozutsumi, Y., et al., *The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins.* Nature, 1988. **332**(6163): p. 462-4.
13. Cox, J., C. Shamu, and P. Walter, *Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase.* Cell, 1993. **73**(6): p. 1197-206.
14. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress.* Molecular Biology of the Cell, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
15. Harding, H., Y. Zhang, and D. Ron, *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase.* Nature, 1998. **397**(6716): p. 271-4.
16. Wang, P., et al., *The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization.* The Journal of Biological Chemistry, 2018. **293**(11): p. 4110-4121.
17. Chen, J., et al., *Cloning of the cDNA of the heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF-2 alpha) kinase of rabbit reticulocytes:*

- homology to yeast GCN2 protein kinase and human double-stranded-RNA-dependent eIF-2 alpha kinase. PNAS, 1991. **88**(17): p. 7729-33.
18. Ranu, R. and I. London, *Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates: purification and initial characterization of the cyclic 3':5'-AMP independent protein kinase of the heme-regulated translational inhibitor*. PNAS, 1976. **73**(12): p. 4349–4353.
 19. Dever, T., et al., *Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast*. Cell, 1992. **68**(3): p. 585-596.
 20. Levin, D., R. Petryshyn, and I. London, *Characterization of double-stranded-RNA-activated kinase that phosphorylates alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2 alpha) in reticulocyte lysates*. PNAS, 1980. **77**(2): p. 832-6.
 21. Harding, H., et al., *An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress*. Molecular Cell, 2003. **11**(3): p. 619–633.
 22. Scheuner, D., et al., *Translational Control Is Required for the Unfolded Protein Response and In Vivo Glucose Homeostasis*. Molecular Cell, 2001. **7**(6): p. 1165–1176.
 23. Harding, H., et al., *Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells*. Molecular Cell, 2000. **6**(5): p. 1099–1108.
 24. Fawcett, T., et al., *Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response*. Biochemical Journal, 1999. **339**(1): p. 135–141.
 25. Wang, X., et al., *Signals from the Stressed Endoplasmic Reticulum Induce C/EBP-Homologous Protein (CHOP/GADD153)*. Molecular and Cellular Biology, 1996. **16**(8): p. 4273-80.
 26. Rutkowski, D., et al., *Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins*. PLoS Biology, 2006. **4**(11): p. e374.
 27. Marciniak, S., et al., *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum*. Genes&Development, 2004. **18**(24): p. 3066-77.
 28. McCullough, K., et al., *Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state*. Molecular and Cellular Biology, 2001. **21**(4): p. 1249-59.
 29. Zinszner, H., et al., *CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum*. Genes&Development, 1998. **12**(7): p. 982-95.
 30. Novoa, I., et al., *Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 α* . Journal of Cell Biology, 2001. **153**(5): p. 1011–1022.
 31. Brex, P., et al., *A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis*. The New England Journal of Medicine, 2002. **346**(3): p. 158-64.
 32. Confavreux, C., et al., *Relapses and progression of disability in multiple sclerosis*. The New England Journal of Medicine, 2000. **343**(20): p. 1430-8.

33. Scalfari, A., et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability*. *Brain*, 2010. **133**(7): p. 1914-29.
34. Miller, D., et al., *Effect of interferon-beta1b on magnetic resonance imaging outcomes in secondary progressive multiple sclerosis: results of a European multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *European Study Group on Interferon-beta1b in secondary progressive multiple sclerosis*. *Annals of Neurology*, 1999. **46**(6): p. 850-9.
35. Coles, A., et al., *Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis*. *Annals of Neurology*, 1999. **46**(3): p. 296-304.
36. Kappos, L., et al., *Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study*. *The Lancet*, 2018. **391**(10127): p. 1263-1273.
37. Ludwin, S., *Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity*. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 1978. **39**(6): p. 597-612.
38. Morell, P., et al., *Gene Expression in Brain during Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1998. **12**(4-5): p. 220–227.
39. Stidworth, M., et al., *Quantifying the Early Stages of Remyelination Following Cuprizone-induced Demyelination*. *Brain Pathology*, 2003. **13**(3): p. 329-39.
40. Hiremath, M., et al., *Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice*. *Journal of Neuroimmunology*, 1998. **92**(1-2): p. 38–49.
41. Goldberg, J., et al., *Short-Term Cuprizone Feeding Induces Selective Amino Acid Deprivation with Concomitant Activation of an Integrated Stress Response in Oligodendrocytes*. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2013. **33**(8): p. 1087–1098.
42. Höfllich, K., et al., *Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach*. *Brain Research*, 2016. **1650**: p. 125–133.
43. Ludwin, S. and E. Johnson, *Evidence for a "dying-back" gliopathy in demyelinating disease*. *Annals of Neurology* 1981. **9**(3): p. 301-5.
44. Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, and B.-N. A., *A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells*. *European Journal of Immunology*, 1995. **25**(7): p. 1951-9.
45. Ben-Nun, A., H. Wekerle, and I. Cohen, *The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis*. *European Journal of Immunology*, 1981. **11**(3): p. 195-9.
46. Trotter, J., et al., *Myelin proteolipid protein induces demyelinating disease in mice*. *Journal of the Neurological Sciences*, 1987. **79**(1-2): p. 173-88.
47. Scheld, M., et al., *Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain*. *Journal of Neuroscience*, 2016. **36**(4): p. 1410-1415.

48. Rütter, B., et al., *Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression*. *Glia*, 2017. **65**(12): p. 1900-1913.
49. Sidman, R., J. Angevine, and E. Pierce, *Atlas of the mouse brain and spinal cord*: <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>. Harvard University Press Cambridge., 1971.
50. Hochstrasser, T., et al., *Cuprizone-Containing Pellets Are Less Potent to Induce Consistent Demyelination in the Corpus Callosum of C57BL/6 Mice*. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2017. **61**(4): p. 617–624.
51. Kabat, E., A. Wolf, and A. Bezer, *The Rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants*. *J Exp Med.* , 1947. **85**(1): p. 117–130.
52. Richter-Landsberg, C. and M. Heinrich, *OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures*. *Journal of Neuroscience Research*, 1996. **45**(2): p. 161-73.
53. Jung, M., et al., *Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo*. *European Journal of Neuroscience*, 1995. **7**(6): p. 1245–1265.
54. Maggi, P., et al., *The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter*. *Annals of Neurology*, 2014. **76**(4): p. 594-608.
55. Thastrup, O., et al., *Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(7): p. 2466-70.
56. Wootton, L. and F. Michelangeli, *The effects of the phenylalanine 256 to valine mutation on the sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) Ca²⁺ pump isoforms 1, 2, and 3 to thapsigargin and other inhibitors*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(11): p. 6970-6.
57. Blakemore, W., *Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice*. *Journal of Neurocytology*, 1972. **1**(4): p. 413–426.
58. Locatelli, G., et al., *Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity*. *Nature Neuroscience*, 2012. **15**(4): p. 543-50.
59. Song, B., et al., *Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008. **118**(10): p. 3378-89.
60. Ji, C., et al., *Role of CHOP in Hepatic Apoptosis in the Murine Model of Intra-gastric Ethanol Feeding*. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*, 2006. **29**(8): p. 1496-503.
61. Namba, T., et al., *Positive role of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis*. *The American Journal of Pathology*, 2009. **174**(5): p. 1786-98.
62. Thorp, E., et al., *Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice lacking CHOP*. *Cell Metabolism*, 2009. **9**(5): p. 474-81.

63. Silva, R., et al., *CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism*. Journal of Neurochemistry, 2005. **95**(4): p. 974-86.
64. Prasanthi, J., et al., *Silencing GADD153/CHOP gene expression protects against Alzheimer's disease-like pathology induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit hippocampus*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26420.
65. Pennuto, M., et al., *Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice*. Neuron, 2008. **57**(3): p. 393-405.
66. Southwood, C., et al., *The Unfolded Protein Response Modulates Disease Severity in Pelizaeus-Merzbacher Disease*. Neuron, 2002. **36**(4): p. 585-596.
67. Deslauriers, A., et al., *Neuroinflammation and Endoplasmic Reticulum Stress Are Coregulated by Crocin To Prevent Demyelination and Neurodegeneration*. The Journal of Immunology, 2011. **187**(9): p. 4788-4799.
68. Harding, H., et al., *Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in Perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival*. Molecular Cell, 2001. **7**(6): p. 1153-1163.
69. Teske, N., et al., *Chemical hypoxia-induced integrated stress response activation in oligodendrocytes is mediated by the transcription factor nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2)*. Journal of Neurochemistry, 2018. **144**(3): p. 285-301.
70. Lin, W., et al., *Interferon-gamma inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress*. Brain, 2006. **129**(5): p. 1306-18.
71. Huang, H., et al., *Neuroprotection by eIF2 α -CHOP inhibition and XBP-1 activation in EAE/optic neuritis*. Cell Death & Disease, 2017. **8**(7): p. e2936.
72. Sawcer, S., et al., *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. Nature, 2011. **476**: p. 214–219.
73. Lin, W., et al., *The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(2): p. 448-56.
74. Lin, W., et al., *Oligodendrocyte-specific activation of PERK signaling protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of Neuroscience, 2013. **33**(14): p. 5980–5991.
75. Way, S., et al., *Pharmaceutical integrated stress response enhancement protects oligodendrocytes and provides a potential multiple sclerosis therapeutic*. Nature Communications 2015. **13**(6): p. 6532.
76. Lin, J., et al., *Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4170.
77. Fhlathartaigh, M., et al., *Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination*. Acta Neuropathologica Communications, 2013. **15**(1): p. 37.
78. Chakrabarty, A., M. Danley, and S. LeVine, *Immunohistochemical localization of phosphorylated protein kinase R and phosphorylated eukaryotic initiation factor-2 α in the central nervous system of SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis*. Journal of Neuroscience Research, 2004. **76**(6): p. 822–833
79. Taniuchi, S., et al., *Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 α kinases*. Scientific Reports, 2016. **16**(6): p. 32886.

Eidesstattliche Versicherung

Gottschling, Malin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die Rolle des Transkriptionsfaktors CHOP in Mausmodellen der Multiplen Sklerose.“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 20.07.2019

Ort, Datum

Malin Gottschling

Unterschrift Doktorand

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp. Seine Anregungen und sein großes persönliches Engagement empfand ich stets als große Motivation. Ich möchte mich für die herausragende Betreuung während der gesamten Zeit bedanken.

Ebenso ein großer Dank an Frau Dr. Tanja Hochstrasser. Sie war sowohl fachlich als auch persönlich eine Bereicherung für diese Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz, dass ich meine Promotion unter solch guten Rahmenbedingungen an seinem Lehrstuhl anfertigen durfte.

Von Herzen ein Dank an die Mitarbeiter/innen des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München für die schöne Zeit im Labor. Für die umfangreiche Unterstützung, die stetige Geduld und Hilfsbereitschaft danke ich besonders Frau Beate Aschauer, Frau Astrid Baltruschat und Frau Sarah Wübbel.

Ein Dank an meine Familie und meine Freunde. Der größte Dank gebührt meinen Eltern für die immerwährende und unbegrenzte Unterstützung während meines gesamten Studiums.