

Untersuchung der Aktivierung von Astrozyten bei experimenteller, toxischer Demyelinisierung

Dr. rer. nat. Markus Daerr

München 2021

Aus der Anatomischen Anstalt Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Untersuchung der Aktivierung von Astrozyten bei experimenteller,
toxischer Demyelinisierung

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

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Markus Daerr

aus
Burghausen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp
Mitberichterstatter:	PD Dr. Klaus Dornmair apl. Prof. Dr. rer. nat. Ingrid Boekhoff
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	11.03.2021

Eidesstattliche Versicherung

Daerr, Markus

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

Untersuchung der Aktivierung von Astrozyten bei experimenteller,
toxischer Demyelinisierung

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 Fundstell 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 12.03.2021

Dr. Markus Daerr

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die diese Arbeit möglich gemacht haben und mich dabei Unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, für die exzellente Betreuung meiner Promotion danken. Er stand mir während der gesamten Arbeit sowohl bei der Durchführung der Versuche, als auch bei der Auswertung der Ergebnisse zur Seite. Auch bei der Korrektur meiner Doktorarbeit konnte ich mich jederzeit auf seine Hilfe und seine Anregungen verlassen.

Herr Prof. Dr. med. Christoph Schmitz danke ich dafür, dass ich meine Promotion an seinem Lehrstuhl anfertigen durfte und von allen Mitarbeitern dabei unterstützt wurde.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München, insbesondere Frau Sarah Wübbel, Frau Beate Aschauer und Frau Astrid Baltruschat, die mir die in dieser Arbeit verwendeten Arbeitstechniken beigebracht haben und immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Ebenso danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit. Ihr standet mir immer zur Seite und habt mich auf eure Art unterstützt. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.2	Das Cuprizone-Modell.....	3
1.3	Die Glutamattransporter	5
1.4	Astrozytenmarkerproteine	5
2	Zielsetzung	7
2.1	Veränderung der Genexpression der Glutamattransporter EAAT1-5 im Cuprizone-Modell	7
2.2	Verteilung der astrozytären Marker ALDH1L1 und GFAP in der grauen und weißen Substanz des Gehirns nach Behandlung mit Cuprizone	7
2.3	Veränderung des Genexpressionsmusters von Astrozyten in Cortex und Corpus Callosum nach Behandlung mit Cuprizone	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	8
3.1.1	RNA-Isolation.....	9
3.1.2	Reverse Transkription.....	10
3.1.3	Standard-PCR	12
3.1.4	Gel-Elektrophorese nach einer PCR	15
3.1.5	Primer Design	16
3.1.6	Real-time PCR.....	23
3.1.7	Auswertung rt-PCR.....	25
3.2	Immunhistochemie	26
3.2.1	Immunhistochemische Färbungen.....	26
3.2.2	Puffer und Blockseren	26
3.2.3	Einfache Immunfluoreszenzfärbung	27
3.2.4	Immunfluoreszenzdoppelfärbung	30
3.2.5	Auswertung Immunhistochemie.....	30
3.3	Statistische Auswertung.....	32
3.3.1	Statistische Auswertung der Versuche zur Veränderung der Genexpression der Glutamattransporter EAAT1-4.....	32

3.3.2	Statistische Auswertung der Verteilung von ALDH1L1 und GFAP in der grauen und weißen Substanz des Gehirns nach Behandlung mit Cuprizone	33
3.3.3	Veränderung des Genexpressionsmusters von Astrozyten in Cortex und Corpus Callosum nach Behandlung mit Cuprizone	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Veränderung der Genexpression der Glutamat-transporter EAAT1-4 im Cuprizone-Model.....	35
4.2	Verteilung der astrozytären Biomarker ALDH1L1 und GFAP in der grauen und weißen Substanz nach Behandlung mit Cuprizone	37
4.2.1	Ergebnisse der Färbung mit einem Antikörper gegen ALDH1L1:.....	37
4.2.2	Ergebnisse der Färbung mit einem Antikörper gegen GFAP:	40
4.3	Veränderung des Genexpressionsmusters von Astrozyten in Cortex und Corpus Callosum nach Cuprizone-Intoxikation	43
4.3.1	ALDH1L1	44
4.3.2	GFAP	44
4.3.3	S100 β	45
4.3.4	Vimentin.....	46
4.3.5	BLBP.....	47
5	Diskussion.....	48
5.1	Funktion von Astrozyten im Gesunden und bei ZNS Erkrankungen.....	48
5.2	GFAP als astrozytenspezifischer Marker in immunhistochemischen Färbungen	49
5.3	Astrozytenaktivierung und reaktive Gliose	51
5.3.1	Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von GFAP	53
5.3.2	Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von <i>Aldh1l1</i>	53
5.3.3	Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von Vimentin.....	54
5.3.4	Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von S100 β	55

5.3.5	Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von BLBP.....	56
6	Zusammenfassung.....	57
7	Literaturverzeichnis.....	59

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (Synonym: Encephalomyelitis disseminata, MS) ist eine multifokale, chronische und immunvermittelte entzündlich-degenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) bei der es zur herdförmigen Demyelinisierung von Gehirn und Rückenmark und Schädigung von Axonen kommt.

Die Prävalenz der MS beträgt rund 50-100/100.000 Einwohner und ist besonders hoch in Nordamerika und skandinavischen Ländern. Insgesamt sind jüngere, weiße Frauen häufiger betroffen als Männer und die Erstdiagnose erfolgt meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr.

Bei der MS kann man grundsätzlich drei verschiedene Verlaufsformen der Erkrankung unterscheiden: Bei ca. 85% der Patienten wird die schubförmig-remittierende Form der MS (engl.: relapse-remitting multiple sclerosis, RRMS) diagnostiziert (Abbildung 1).

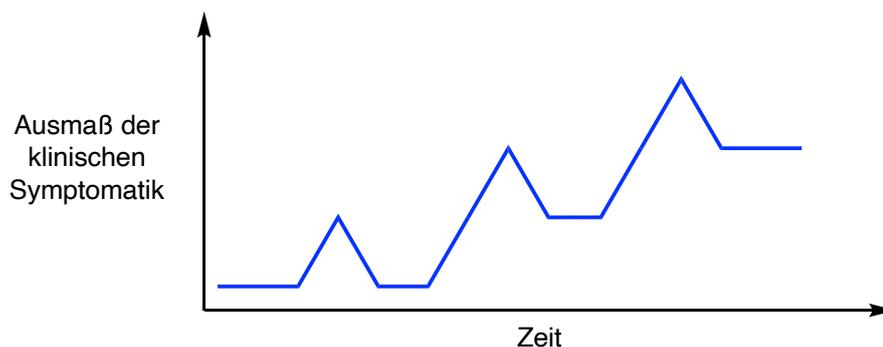


Abbildung 1 Schematische Darstellung des klinischen Verlaufs der RRMS.

Kennzeichnend für diesen Verlauf der Erkrankung sind plötzliche auftretende neuronale Dysfunktionen („Schübe“), die sich je nach Lokalisation der Läsion im ZNS unterschiedlich klinisch äußern. Nach einigen Wochen oder Monaten kommt es dann zu einem partiellen oder vollständigen Rückgang der Symptome. Zwischen den Schüben befinden sich die Patienten in Plateau-Phasen, in denen das Ausmaß der klinischen Symptome stabil ist. Diese Verlaufsform der MS geht im Krankheitsverlauf bei einem Großteil der Erkrankten in die sekundäre-progrediente Form der MS (engl.: secondary-progressive multiple sclerosis, SPMS) über. Diese ist durch eine kontinuierliche Verschlechterung der neuronalen Funktion gekennzeichnet, die zusätzlich durch einzelne Schübe verschlechtert werden kann (Abbildung 2).^[1]

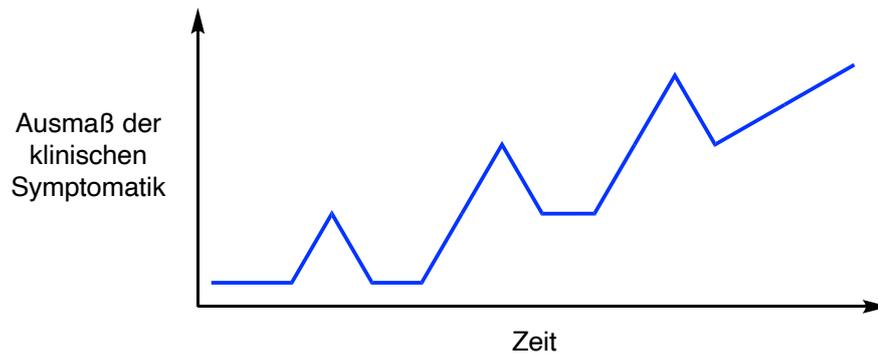


Abbildung 2 Schematische Darstellung des klinischen Verlaufs der SPMS.

Bei ca. 15% der MS-Patienten wird die primär-progrediente MS (PPMS) diagnostiziert. Bei dieser Verlaufsform nimmt die Beeinträchtigung der Patienten durch die neuronale Dysfunktion kontinuierlich zu (Abbildung 3).^[2]

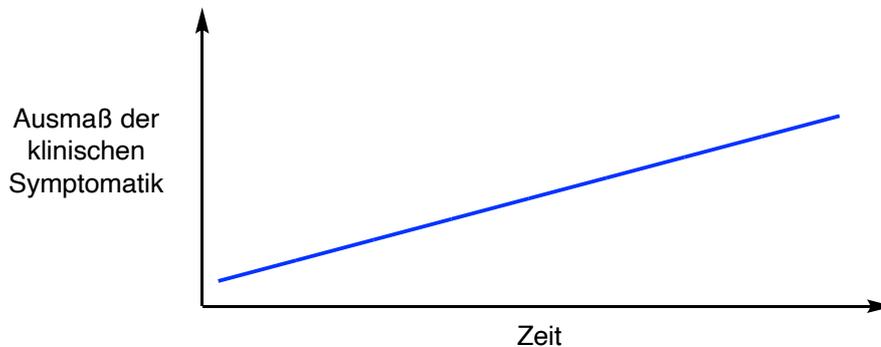


Abbildung 3 Schematische Darstellung des klinischen Verlaufs der PPMS.

Bis heute konnte die genaue Ursache der Erkrankung nicht abschließend geklärt werden. Zwillingsstudien zeigen, dass eine genetische Prädisposition die Entstehung einer MS begünstigen kann, aber nicht alleiniger Auslöser ist, denn nur bei ca. 30% der eineiigen Zwillinge erkranken beide an MS, bei zweieiigen Zwillingen sind es nur ca. 5%.^[3] Neben der genetischen Prädisposition werden zahlreiche Umwelteinflüsse und Risikofaktoren wie Rauchen als wichtige Ätiologiefaktoren angenommen. So zeigen Studien, dass bei Zwillingen bei denen einer der beiden einer stärkeren Sonnenlichtexposition ausgesetzt war, ein geringeres Risiko hat an MS zu erkranken.^[4] Dies spiegelt sich auch in den epidemiologischen Daten wider, da die Wahrscheinlichkeit an MS zu erkranken mit größerem Abstand zum Äquator steigt.^[5] Diese Beobachtungen führten dann zur Vitamin-D-Hypothese, die besagt, dass Patienten mit einem höheren Vitamin-D Serumspiegel ein geringeres Risiko haben an MS zu erkranken.^[6] Auch Infektionen mit Herpesviren wie dem Epstein-Barr-Virus (EBV) oder die humanen Herpes-Viren HHV-4 und HHV-6A stehen im Verdacht die Entwicklung einer MS zu begünstigen.^[7-8]

Um die Pathogenese dieser komplexen Krankheit zu erforschen bedient man sich verschiedener Tiermodelle um die De- und Remyelinisierungsprozesse, sowie die entzündlichen und neurodegenerativen Prozesse besser zu verstehen. So kann man das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), das Cuprizone-Modell, das Lysophosphatidylcholin (LPC) Model oder das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Cup-EAE-Modell zur Untersuchung der MS verwenden.^[9-11] Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Cuprizone-Modell verwendet, welches im nächsten Kapitel kurz umrissen wird.

1.2 Das Cuprizone-Modell

Eines der wichtigsten Tier-Modelle zur Untersuchung der MS ist das Cuprizone-Modell, das zur Gruppe der toxischen Tiermodelle gerechnet wird und ein reversibles De- und Remyelinisierungssystem darstellt.^[12-14] Das verwendete Cuprizone (Bis-cyclohexanon-oxaldihydrazon, Abbildung 4) ist ein Kondensationsprodukt aus Oxalylhydraziden und Cyclohexanon.

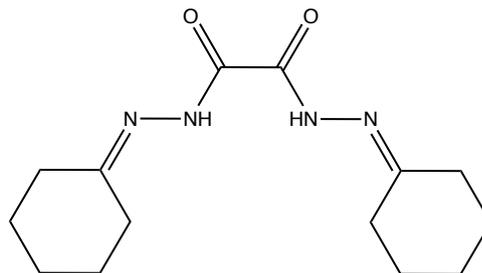


Abbildung 4 Strukturformel von Bis-cyclohexanon-oxaldihydrazon (Cuprizone).

Die ersten Experimente mit Cuprizone im Tierversuch wurden in den späten 1960er Jahren von William Carlton beschrieben.^[15-16] Er stellte damals schon fest, dass Cuprizone, ein Chelator der in der Kupferanalyse verwendet wird, bei den behandelten Tieren zu mikroskopischen Läsionen im Gehirn führt, begleitet von Ödemen, der Ausbildung eines Hydrozephalus, Demyelinisierung und Astrogliose.^[16] Im Lauf der Zeit wurden weitere Experimente mit Cuprizone mit verschiedenen Mäusestämmen (Albino, BALB/cJ, BSVS, CD1, ICI, SJL und Swiss) durchgeführt.^[17] Dabei zeigte sich, dass nicht nur die Dosierung und die Dauer der Cuprizone-Intoxikation entscheidend für die Ergebnisse des durchgeführten Experimentes sind, sondern das Ergebnis auch vom verwendeten Stamm sowie Geschlecht, Alter und Gewicht der Versuchstiere beeinflusst wird.^[18]

Die Beimischung von Cuprizone zum normalen Futter der Versuchstiere führt zu einer reproduzierbaren Demyelinisierung bestimmter Hirnregionen. Dazu zählt auch das mediale Corpus callosum, was den am häufigsten untersuchten Bereich der weißen Substanz in diesem Tiermodell darstellt.^[19] Zu Beginn ging man davon aus, dass sich die Demyelinisierung nach Intoxikation mit Cuprizone auf die weiße Substanz im Bereich des medialen Corpus callosum und den Pedunculus cerebellaris superior beschränkt.^[14] Neuere Studien zeigten jedoch, dass es auch in anderen Gehirnregionen wie dem Hippocampus,^[20-21] dem Zerebellum^[22-23] und in zerebellären Nuclei^[22] und in Teilen der Basalganglien^[24] zur Bildung von Cuprizone induzierten Läsionen kommt. Neben der weißen Substanz kommt es auch in bestimmten Bereichen der grauen Substanz des Cortex und des Hippocampus zur Ausbildung von Läsionen.^[21, 25]

Wird den Versuchstieren für 5 Wochen Cuprizone verabreicht, spricht man von einer akuten Demyelinisierung und es kommt nach Absetzen des Chelators zu Remyelinisierungsvorgängen.^[9] Auf molekularer Ebene lässt sich dies durch die Expression von Myelinproteinen (2',3'-zyklische Phosphodiesterase (CNPase), Myelin-basisches-Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG) Proteolipid-Protein (PLP)) belegen.^[26] Erfolgt die Intoxikation mit Cuprizone für 12 Wochen oder länger, so spricht man von einer chronischen Demyelinisierung. Remyelinisierungsprozesse lassen sich nach dieser Zeit kaum bzw. gar nicht mehr beobachten.^[9]

Der zugrundeliegende Mechanismus der Cuprizone-induzierten Wirkungen ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass Cuprizone in den Versuchstieren zur Ausbildung von Riesenmitochondrien führt, die sich sowohl in der Leber, als auch in den Oligodendrozyten der Tiere nachweisen lassen. ^[27-29] Da Cuprizone Veränderungen der Morphologie der Mitochondrien bewirkt, vermutet man, dass die neurotoxischen Effekte dieses Kupfer-Chelators auf Veränderungen der Zellatmung beruhen, was eine der Kernaufgaben der Mitochondrien ist.^[30] Welcher Mechanismus genau zur Apoptose der Oligodendrozyten führt, konnte aber abschließend nicht geklärt werden. Die Intoxikation mit Cuprizone führt aber nachweislich zu oxidativem Stress.^[17]

Zusätzlich zur Apoptose der Oligodendrozyten kommt es, abhängig von der Dauer und Konzentration der Intoxikation mit Cuprizone, auch zu einer Mikogliaaktivierung und zur einer Astroglieose in den demyelinisierten Regionen.^[31]

1.3 Die Glutamattransporter

Veränderungen der Genexpression der Glutamattransporter EAAT1-5 stellen ein interessantes Target für die Erforschung der MS dar, da ein Zusammenhang zwischen der Neurotoxizität einer erhöhten extrasynaptischen Glutamatkonzentration und MS vermutet wird.^[32-33] Die einzelnen Transporter sind im Gehirn unterschiedlich verteilt: EAAT1 und EAAT2 werden hauptsächlich von Astrozyten exprimiert.^[34] Dabei ist aber der Transporter EAAT2 am wichtigsten für die Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt.^[35] Die Transporter EAAT3 und EAAT4 werden hauptsächlich von neuronalen Zellen exprimiert.^[36-37] Der Transporter EAAT5 wird dagegen hauptsächlich in der Retina gefunden.^[38]

1.4 Astrozytenmarkerproteine

Es gibt unzählige Biomoleküle die für die Untersuchung der Astrozyten in der Forschung verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Astrozytenmarker ALDH1L1, GFAP, S100 β , Vimentin und BLBP untersucht.

ALDH1L1 (Aldehyddehydrogenase 1, Familienmitglied L1) ist ein Enzym, das sowohl in fibrillären als auch protoplasmatischen Astrozyten exprimiert wird und spezifisch für Astrozyten ist.^[39-40] *In vivo* katalysiert das Enzym die Umwandlung von 10-Formyltetrahydrofolat, NADP und Wasser zu Tetrahydrofolat, NADPH und Kohlendioxid.

Das saure Gliafaserprotein (GFAP, engl.: glial fibrillary acidic protein) dagegen ist ein Filamentprotein das im Zytoskelett von reifen Astrozyten exprimiert wird. Dort bestimmt es das Aussehen und die Struktur der Astrozyten, trägt aber auch zur Zellmobilität sowie zur Übertragung molekularer Signale bei.^[41] GFAP ist ein gut etablierter Marker vor allem für aktivierte Astrozyten.

Das Protein S100 β gehört zur Familie der S100 Proteine und ist verantwortlich für die Struktur des Zytoskelettes, die Ca²⁺-Homöostase, die Zellproliferation sowie die Phosphorylierung und den Abbau von Proteinen.^[42] In Astrozyten ist das Protein vorwiegend im Zytoplasma und im Nucleus lokalisiert. Außerdem inhibiert S100 β die Apoptose und Zelldifferenzierung und könnte eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Astrozyten im Rahmen neurodegenerativer Prozesse spielen.^[43]

Vimentin gehört ebenso wie GFAP und anderen Proteinen zu den Intermediärfilamenten der Astrozyten. In unreifen Astrozyten und deren

Vorläuferzellen bestehen die Intermediärfilamente vor allem aus Vimentin und Nestin.^[44-46] In reifen Astrozyten dagegen steigt die Expression von GFAP an, die von Vimentin nimmt ab und kann in manchen Astrozyten nicht mehr nachweisbar sein.^[47] Bereits 1993 konnte gezeigt werden, dass es bei unterschiedlichen Arten der Verletzung des ZNS zu einer Steigerung der Genexpression für GFAP und Vimentin in Astrozyten kommt.^[48]

Das Brain lipid-binding protein (BLBP), auch FABP7 genannt, ist ein vielverwendeter Marker für radiale Gliazellen.^[49-52] Bisherige Ergebnisse unserer Forschungsgruppe zeigen, dass Probleme der Remyelinisierung durch eine Beeinträchtigung des BLBP-Signalweges bedingt sein können und eine bedeutende Rolle bei der Progression der MS spielen könnten.^[53]

2 Zielsetzung

Die MS ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen junger Erwachsener der westlichen Welt. Dennoch ist die Pathogenese nicht abschließend geklärt. In Rahmen dieser Arbeit sollten drei Fragestellungen untersucht werden.

2.1 Veränderung der Genexpression der Glutamattransporter EAAT1-5 im Cuprizone-Modell

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS. Erhöhte Glutamatkonzentrationen wirken neurotoxisch und stehen im Verdacht die Entstehung der MS zu fördern. Ziel dieser Arbeit ist es im Cuprizone-Modell zu untersuchen, ob und wie sich die Genexpression der Glutamattransporter im Verlauf der Intoxikation mit Cuprizone im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren verändert.

2.2 Verteilung der astrozytären Marker ALDH1L1 und GFAP in der grauen und weißen Substanz des Gehirns nach Behandlung mit Cuprizone

ALDH1L1 und GFAP sind gut etablierte Marker für die Untersuchung von Astrozyten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte im Cuprizone-Modell untersucht werden, ob sich die Verteilung dieser Marker im zeitlichen Verlauf der Cuprizone-Intoxikation in der grauen und weißen Substanz des Gehirns verändert.

2.3 Veränderung des Genexpressionsmusters von Astrozyten in Cortex und Corpus Callosum nach Behandlung mit Cuprizone

Neben ALDH1L1 und GFAP werden auch die Proteine S100 β , Vimentin und BLBP für die Untersuchung von Astrozyten verwendet. Ziel dieser Arbeit war es im Cuprizone-Modell zu untersuchen ob und wie sich die Genexpression dieser Astrozytenmarker im zeitlichen Verlauf der Intoxikation mit Cuprizone im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren verändert.

3 Material und Methoden

3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Seit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Jahr 1983 durch Kary Mullis steht eine simple, aber hoch effiziente molekularbiologische Methode für die medizinische und biologische Forschung zur Verfügung. Die Vervielfältigung eines oder mehrerer DNA-Abschnitte zu mehreren tausend Kopien kann für eine Vielzahl an molekularbiologischen Untersuchungstechniken wie z.B. Genexpressionsanalyse, Untersuchung von Erbkrankheiten, Untersuchungen des Genoms aber auch forensische Untersuchungen oder Vaterschaftstests verwendet werden. Für die Entwicklung der PCR wurde Mullis Jahr 1993 zusammen mit Michael Smith für den Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet.

Eine PCR umfasst mehrere sich wiederholende Schritte die aus Aufheizen und Kühlen der DNA-Probe besteht, bei der die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt werden, sogenanntes Schmelzen, und anschließend die DNA enzymatisch vervielfältigt wird. Für die PCR werden kurze DNA-Fragmente, sogenannte Primer, benötigt, die komplementär an einen DNA-Strang binden und somit spezifisch das Gen bzw. den Abschnitt auf der DNA markieren der durch die DNA-Polymerase amplifiziert werden soll. Während der Heiz- und Kühlzyklen der PCR dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge selber als Vorlage für die Replikation, so dass der durch die Primer definierte Genabschnitt exponentiell vervielfältigt wird.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die PCR verwendet um den Gehalt an mRNA, die für spezifische Zielproteine codiert, in verschiedenen Geweben zu bestimmen. Dazu sind folgende Schritte notwendig: Isolation der RNA, reverse Transkription der messenger-RNA (mRNA) zu komplementärer DNA (cDNA) und letztlich die PCR. Da die grundlegenden Arbeitstechniken zur Genexpressionsanalyse identisch sind, werden erst allgemein alle Arbeitsschritte beschrieben. Die versuchsspezifischen Parameter werden dann im nächsten Kapitel erklärt.

3.1.1 RNA-Isolation

Tabelle 1 Chemikalien für die RNA-Isolation

Reagenz	Firma	Bestellnummer
peqGold TriFast	Peqlab	30-2020
Chloroform $\geq 99\%$, p.a.	Carl Roth	3313.1
2-Propanol $\geq 99.8\%$, p.a.	Carl Roth	6752.4
Ethanol (aq., 75%, hergestellt aus Ethanol p.a.)	EMD Milipore Corporation	1.00983.1000
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo Fischer Sci	10977

Die Isolation und Reinigung intakter RNA ist aufgrund ubiquitär vorhandener Ribonuklease-Enzyme (RNAsen) technisch anspruchsvoll. Hier wird die Phenol-Chloroform Extraktionsmethode, eine flüssig-flüssig Extraktion, bei der DNA, RNA und Proteine getrennt werden, verwendet. Dazu wurde der kommerziell erhältliche Lysispuffer *peqGOLD* benutzt, eine Lösung aus Phenol und Guanidinothiocyanat, die den Zellaufschluss, die Inaktivierung der RNAsen und die Stabilisierung der RNA gewährleistet.

Um RNA aus Gewebe zu isolieren muss dieses homogenisiert und die Zellen lysiert werden. Dazu wurde das zu untersuchende Gewebe in einen mit 1 ml *peqGold* gefülltes Homogenisator-Gefäß, das zusätzlich kleine Kügelchen enthält, gegeben und anschließend für 30 Sekunden bei 3.000 rpm mit Hilfe des Precellys® Minilys Personal Tissue Homogenizer geschüttelt. Durch die kräftige dreidimensionale Bewegung und die Kügelchen wird das Gewebe zerkleinert und die Zellen durch das *peqGOLD* lysiert. Nach dem Zellaufschluss werden die Proben auf Eis gelagert, bis sich der entstandene Schaum zurückgebildet hat. Anschließend werden die Proben fünf Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um eine vollständige Dissoziation von Nucleoprotein-komplexen zu gewährleisten. Danach werden jeweils 1 ml der Probenlösung in neue, blau beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt, mit jeweils 200 μ L Chloroform versetzt und mit Hilfe des Vortex-Mischers kräftig durchmischt.

Die Proben werden dann für 10 Minuten auf Eis gelagert und danach für 20 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bilden sich im Eppendorf-Gefäß drei Phasen aus: Die untere organische Phase, die vor allem Proteine enthält, die mittlere Phase, die hauptsächlich aus DNA besteht und die obere wässrige Phase, in der vor allem die RNA enthalten ist. Durch mehrere Wasch- und

Zentrifugationsschritte wird die RNA aus der wässrigen Phase isoliert und gereinigt: Die wässrige Phase wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe des gleichen Volumens an eiskaltem Isopropanol und anschließendes Mischen mit dem Vortex-Mischer ausgefällt. Um die RNA möglichst quantitativ zu erhalten wird die Probe über Nacht bei -20 °C gelagert. Dieser Schritt ist vor allem dann wichtig, wenn nur kleine Mengen an mRNA zu erwarten sind, wurde aber bei jeder mRNA-Isolation durchgeführt um ein standardisiertes Protokoll zu verfolgen. Am nächsten Tag wird die Probe für 60 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abdekantiert, die Probe mit 1 ml eiskaltem wässrigen Ethanol (75%) versetzt und dann wieder für 10 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt, bestehend aus zentrifugieren, abdekantieren und waschen mit Ethanol (p.a.) wird insgesamt drei Mal durchgeführt. Die Proben werden anschließend getrocknet in dem sie kopfüber auf Zellstoff gelagert werden. Die so erhaltene RNA wird in 12 µL auf 55 °C vorgeheiztem UltraPure™ Wasser resuspendiert und für 30 Minuten bei 300 rpm und 55 °C in einem Rührschüttler inkubiert, dann bei -80 °C eingefroren oder sofort weiterverwendet.

3.1.2 Reverse Transkription

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien für die Reverse Transkription

Reagenz	Firma	Bestellnummer
5X First Strand Buffer	Thermo Fischer Sci	28025-021
DTT 0.1 M	Thermo Fischer Sci	280-021
dNTP Mix 10 mM	Bioline	BIO-39044
Random Primer	Thermo Fischer Sci	48190-011
UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled Water	Thermo Fischer Sci	10977
M-MLV-RT	Thermo Fischer Sci	28025-021

Alle Anwendungsmöglichkeiten der PCR beruhen auf der Verwendung von DNA-abhängigen DNA-Polymerasen, welche die DNA amplifizieren, weshalb die zuvor isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden muss. Dazu verwendet man eine reverse Transkriptase, also eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche die Einzelstrang RNA in cDNA umschreibt. Gut untersuchte reverse Transkriptasen sind

u.a. die HIV-1 reverse Transkriptase des humanen immunodefizit Virus Typ 1 (PDB 1HMY), die M-MLV reverse Transkriptase aus dem Moloney murinen Leukämie Virus oder die AMV reverse Transkriptase aus dem Vogel myeloblastosis Virus. Die Entdeckung der reversen Transkription, unabhängig voneinander von Howard Temin und David Baltimore, im Jahr 1970, führte zu einem Paradigmenwechsel, da es dem zentralen Dogma der Molekularbiologie widersprach nachdem der Informationsfluss nur von DNA zu RNA, die dann zu Proteinen translatiert wird, möglich ist.

In diesen Versuchen wird das M-MLV Kit von Invitrogen verwendet. Wie bei fast allen Polymerasen benötigt die M-MLV Polymerase kleine doppelsträngige RNA-cDNA Abschnitte um die Reaktion starten zu können. Hierin begründet sich weshalb in der Reaktionsmischung Primer vorhanden sein müssen. Für diese Versuche wurden sogenannte Random Primer verwendet. Diese Primer bestehen normalerweise aus Hexameren, also kleinen DNA-Strängen aus sechs Nucleotiden, die sich zufällig an die mRNA anlagern und somit die gesamte mRNA für die reverse Transkriptase zugänglich machen.

Durch die PCR wird der unterschiedliche Gehalt an cDNA bestimmt. Es muss deshalb sichergestellt sein, dass für die reverse Transkription von allen verwendeten Proben immer der gleiche Gehalt an gesamt-mRNA verwendet wird. In diesen Versuchen wurde immer 1 μg an gesamt-mRNA gelöst in 11 μl ultra-pure Wasser verwendet. Dazu wird die RNA-Konzentration der Proben mit Hilfe des Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spektrophotometer bestimmt, ein Volumen das 1 μg an gesamt-mRNA enthält entnommen, und auf 11 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Falls eine Probe bei der RNA-Konzentrationsmessung besonders viel mRNA enthält und somit nur sehr kleine Volumina pipettiert werden müssten wird die Probe erst auf eine Konzentration zwischen 100 und 500 $\text{mg}/\mu\text{l}$ vorverdünnt und die Konzentration anschließend nochmal gemessen. Erst dann wird die Proben für die reverse Transkription vorbereitet. Zusätzlich zu den Proben wurde ein weiteres Eppendorf-Gefäß mit 11 μl ultra-pure Wasser als negativ-Kontrolle gefüllt. Mit dieser negativ-Kontrolle wurde im Weiteren genauso verfahren wie mit den Proben. Alle Proben wurden für fünf Minuten bei 70 °C im Thermomix inkubiert um sie zu denaturieren. Die Proben wurden dann für fünf Minuten auf Eis gelagert. Währenddessen wurden die Reagenzien als sogenannter Mastermix, vorbereitet. Dazu wurden folgende Reagenzien in ein gemeinsames Eppendorf-Gefäß pipettiert (Tabelle 3):

Tabelle 3 Mastermix für die reverse Transkription

Reagenz:	Volumen:
5X Puffer	4 μ l
DTT	2 μ l
dNTP Mix	1 μ l
Random Primer	0.1 μ l
M-MLV	1 μ l

Die angegebenen Volumina sind die benötigten Mengen für eine singuläre Probe. Da man aus technischen Gründen nicht das gesamte Volumen aus einem Eppendorf-Gefäß mit einer Pipette entnehmen kann, wird der Mastermix im Überschuss hergestellt. Der Mastermix wird kurz geschüttelt, jedoch ohne Verwendung des Vortex-Mischers, und kurz zentrifugiert. Zu den Proben wird dann jeweils 8.1 μ l des Mastermix dazugegeben und die Proben für 50 Minuten bei 37 °C für die reverse Transkription inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren werden die Proben dann für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Proben werden dann kurz zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.3 Standard-PCR

Tabelle 4 Verwendete Chemikalien für die Standard-PCR

Reagenz	Firma	Bestellnummer
10X PCR Puffer ohne Mg	Thermo Fischer Sci	Y02028
50 mM MgCl ₂	Bioline	BIO-37026
dNTP Mix 10 mM	Bioline	BIO-39044
Taq-Polymerase: Biotaq	Bioline	21040
UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled Water	Thermo Fischer Sci	10977

Um zu überprüfen, ob während der reversen Transkription erfolgreich cDNA generiert worden ist, wird im Anschluss eine Endpunkt-PCR Analyse durchgeführt. Dazu werden Primerpaare von Genen verwendet, von denen die Länge des PCR Produktes bekannt ist und die im Normalfall in jeder Zelle enthalten sind. Diese Gene werden auch „Housekeeping Gene“ genannt. Typische Housekeeping Gene sind beispielsweise Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH), Beta Actin oder

Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1 (HPRT). In dieser Arbeit wird als Housekeeping Gen für die Standard-PCR HPRT verwendet. Die Sequenz des Primerpaares ist in Tabelle 5 angegeben. Die Länge des PCR-Produktes beträgt bei diesem Primerpaar 249 Basenpaare und die ideale Temperatur für die Anlagerung der Primerpaare, die sogenannte „annealing temperature“ (T_A) ist 62 °C.

Tabelle 5 Nucleotidsequenz des Primerpaares für HPRT

Name:	Sequenz
Forward-Primer	GCTGGTGAAAAGGACCTCT
Reverse-Primer	CACAGGACTAGAACACCTGC

Bei dem verwendeten Primer für HPRT gibt es noch eine Besonderheit: es handelt sich dabei um einen sogenannten Exon-Intron-Spanner, d.h. zwischen den DNA-Abschnitten, in denen der Primer bindet liegt in der nicht prozessierten Zell-DNA mindestens ein Intron. Dieses wird im Rahmen der Transkription durch Nucleasen entfernt. Der Vorteil der Verwendung von Primerpaaren die diese Eigenschaft besitzen ist, dass man dadurch differenzieren kann, ob die im Gel beobachtete Bande von der genomischen DNA stammt oder von der prozessierten cDNA. Sollte die isolierte mRNA mit genomischer DNA verunreinigt sein und man verwendet einen Exon-Intron-Spanner als Primer erhält man nach der Kontroll-PCR auf dem Gel zwei Banden. Eine die von der cDNA und eine von der genomischen DNA stammt. Das PCR-Produkt der genomischen DNA ist dabei immer länger als das von der cDNA und wandert dementsprechend weniger weit in der Gel-Elektrophorese. Somit kann die erfolgreiche mRNA Isolierung, die reverse Transkription und die Reinheit der Probe durch eine einzige PCR untersucht werden.

Für die Standard-PCR werden die untersuchten Proben aufgetaut, mit Hilfe des Vortex-Mischers gemischt und kurz zentrifugiert. Währenddessen wird der Mastermix hergestellt und die benötigten Eppendorf-Gefäße mit einem schwarzen Stift beschriftet. Der Mastermix wird im Überschuss mit den in Tabelle 6 angegebenen Volumina pipettiert.

Tabelle 6 Volumenangaben des Mastermix für die Standard-PCR

Reagenz:	Volumen:
Up-H ₂ O	9.3 μ l
10X PCR Puffer	1.25 μ l
MgCl ₂	0.38 μ l
dNTPs 10 mM	0.25 μ l
Forward-Primer	0.25 μ l
Reverse-Primer	0.25 μ l
Taq Polymerase	0.08 μ l

Der Mastermix wird ohne Verwendung des Vortex-Mischers gemischt, kurz zentrifugiert und im Anschluss werden je 11,5 μ l in die vorbereiteten Eppendorf-Gefäße pipettiert. Zu den Eppendorf Gefäßen wird dann jeweils 1 μ l der zu untersuchenden cDNA gegeben. Neben den Eppendorf-Gefäßen mit der zu untersuchenden cDNA wird noch eine Negativ- sowie eine Positivkontrolle vorbereitet. Für die Negativkontrolle wird anstelle der cDNA 1 μ l up-H₂O pipettiert. Als Positivkontrolle wird eine beliebige cDNA verwendet, von der man bereits weiß, dass sie intakte und reine cDNA enthält. Die Proben werden anschließend kurz zentrifugiert, das entsprechende PCR-Programm im Thermocycler ausgewählt und die PCR gestartet. Für die Standard-PCR wird folgendes Programm verwendet (Tabelle 7)

Tabelle 7 PCR-Programm für die Standard-PCR mit HPRT

Schritt:	Temperatur: [°C]	Zeit: [sek]
1	95	180
2	95	40
3	62	40
4	72	45
5	72	45
6	10	

← 30x

Bevor die Proben in den Thermocycler gestellt werden wird dieser auf 96 °C vorgeheizt. Für die Standard-PCR werden die Schritte 2-4 insgesamt 30-mal wiederholt. Schritt 1 wird nur beim ersten Zyklus durchgeführt und dient der Aktivierung der verwendeten Polymerase. Bei Schritt 2 wird die Probe denaturiert, in Schritt drei lagern sich die Primer an die cDNA an, Schritt vier ist die eigentliche PCR und Schritt

fünf wird nur zum Schluss zur letzten Verlängerung der cDNA Kopien durchgeführt. Schritt sechs dient zum Kühlen der Proben nach der PCR. Im Anschluss an die Standard-PCR wird eine Gelelektrophorese durchgeführt um das Ergebnis der PCR zu visualisieren.

3.1.4 Gel-Elektrophorese nach einer PCR

Tabelle 8 Verwendete Chemikalien für die Gelelektrophorese nach Standard-PCR

Reagenz	Firma	Bestellnummer
Agarose	Roth	3810.3
Easy-Ladder I	Bioline	BIO-33062
Midori Green Advance	Biozym	617004
Tris-Acetat-EDTA-Puffer		
5X DNA loading Buffer Red	Bioline	BIO-37068

Für die Herstellung des Agarose-Gels wird erst eine übersättigte Agarose-Lösung hergestellt. Dafür werden n g Agarose in $[(n/2) \times 100]$ ml Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer gelöst und unter Verwendung einer Mikrowelle aufgeköcht. Die heiße Agarose-Lösung wird auf $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und mit $n/2\ \mu\text{L}$ Midori Green, das zum Anfärben der DNA im Agarose-Gel benötigt wird, versetzt. Die so präparierte noch heiße Agarose-Lösung wird blasenfrei in die Laufkammer gegossen und der Kamm zum Ausbilden der Probenaschen eingesetzt. Das Gel wird, bis es vollständig erstarrt ist, bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das fertige Gel wird in die Laufkammer eingesetzt und der TAE-Puffer eingefüllt bis das Gel vollständig benetzt ist. Der Kamm wird entfernt und in die erste der so erhaltenen Gel-Taschen werden $5\ \mu\text{l}$ Easy-Ladder pipettiert. Dabei handelt es sich um DNA-Fragmente mit einer Länge von 2000, 1000, 500, 250 und 100 Basenpaaren. Durch Vergleich der Laufstrecke lässt sich die Länge des untersuchten PCR-Produktes abschätzen. Zu den Proben der Standard-PCR wird jeweils $2,5\ \mu\text{l}$ des DNA-loading Puffers gegeben und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren durchmischt. Die so präparierten Proben werden in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Durch Anlegen von 240 V Gleichspannung für 45 Minuten wird das PCR-Produkt aufgetrennt. Das Gel wird aus der Kammer genommen und die cDNA Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.5 Primer Design

Bevor man eine Genexpressionsanalyse durchführen kann, muss ein geeignetes Primer-Paar bestehend aus „Forward-Primer“ und „Reverse-Primer“ für das „gene of interest“ (engl. für Gen von Interesse) gefunden und dessen annealing temperature (engl. Für Anlagerungs-Temperatur) bestimmt werden. Dazu muss die DNA-Sequenz des translatierten und prozessierten gene of interest bekannt sein (cDNA). Diese DNA-Sequenz kann man z.B. auf der Mouse Genome Informatics Website^[54] abrufen. Auf der Homepage des National Center for Biotechnology Information (NCBI)^[55] kann man dann mit Hilfe des dort zur Verfügung gestellten Algorithmus des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)^[56] ein geeignetes Primerpaar finden. Das BLAST-Tool gibt dabei auch Informationen über die Länge des durch die PCR generierten Amplikons. Die gefundenen Primerpaare werden nochmal hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft, in dem man den BLAST-Algorithmus mit den gefundenen Primer-Sequenzen auf das gesamte Genom der Maus anwendet. Idealerweise sollte das gefundene Primer-Paar nur für das gene of interest passen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für dasselbe gene of interest jeweils 2 Primer-Paare generiert, und bei Sigma-Aldrich bestellt. Die verwendeten Primer-Paare sind in Tabelle 9 angegeben. Bereits etablierte Primersequenzen können für die beiden Spezies Maus und Mensch auf der Homepage <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> entnommen werden.

Tabelle 9 Übersicht über die Verwendeten Primer-Paare der gene of interest

gene of interest		Primer-Sequenz (5'-3')	Länge des Amplikons [bp]
SLC1A1 (EAAT3) Primer 1	Forward	TTCCGCTTTGCCTTGGGTAT	86
	Reverse	CGGAATGTAAGTGGCAGGGT	
SLC1A1 (EAAT3) Primer 2	Forward	CAGTTACATTCCGCTGTGCG	152
	Reverse	GTCCAAGCCATTCAGTTGCG	
SLC1A2 (EAAT2) Primer 1	Forward	TTCCCGGGGACATACTCAT	261
	Reverse	ATCCAGGCTAGACACCTCGT	

Tabelle 9 Fortsetzung

gene of interest		Primer-Sequenz (5'-3')	Länge des Amplikons [bp]
SLC1A2 (EAAT2) Primer 2	Forward	GGTTTAACGGTTAGCGGGGA	96
	Reverse	ACACATGCCCTGACTGATGG	
SLC1A3 (EAAT1) Primer 1	Forward	CTGGTAACCCGGAAGAACCC	162
	Reverse	GGGGAGCACAAATCTGGTGA	
SLC1A3 (EAAT1) Primer 2	Forward	TTTCTCTCTAGGGGCAGGCT	140
	Reverse	CAGAAGGGAGGGCCTCTAGT	
SLC1A6 (EAAT4) Primer 1	Forward	TCTGGGGACTGCCGAGATAA	78
	Reverse	TCGAGCACACAAATGCAACAG	
SLC1A6 (EAAT4) Primer 2	Forward	CACCAGTGGGCATCCTGTTC	142
	Reverse	ATAAGGGGCAACACACCACC	
SLC1A7 (EAAT5) Primer 1	Forward	GACCACGTGGCCTGCTCTAA	92
	Reverse	GTCCAGAGGGAAGCCACAAT	
SLC1A7 (EAAT5) Primer 2	Forward	GTGGCCTGCTCTAATTTCCCA	215
	Reverse	CTGTTGGCACCATTCCATGC	
GFAP Primer 1	Forward	ACCAGCTTACGGCCAACAG	198
	Reverse	CCAGCGATTCAACCTTTCTCT	
GFAP Primer 2	Forward	TCTCGAATGACTCCTCCACTC	243
	Reverse	AAGCTCCGCCTGGTAGACAT	
ALDH1L1 Primer 1	Forward	GGTTTACTGCCAGCTAAGGAAG	205
	Reverse	CACGTTGAGTTCTGCACCCA	
ALDH1L1 Primer 2	Forward	AGCCACCTATGAGGGCATTTC	158
	Reverse	TGAGTGTCGAGTTGAAAAACGTC	

Tabelle 9 Fortsetzung

gene of interest		Primer-Sequenz (5'-3')	Länge des Amplikons [bp]
S100 β Primer 1	Forward	TGGTTGCCCTCATTGATGTCT	179
	Reverse	CCCATCCCCATCTTCGTCC	
S100 β Primer 2	Forward	GGTTGCCCTCATTGATGTCT	157
	Reverse	CGTCTCCATCACTTTGTCCA	
Vimentin Primer 1	Forward	ATTTTGCCCTTGAAGCTGCTAAC	256
	Reverse	TCAACCAGAGGAAGTGA CTCCAG	
Vimentin Primer 2	Forward	TGCTTCTCTGGCACGTCTTG	128
	Reverse	GGACATGCTGTTCTGAATCTG	
BLBP Primer 1	Forward	GGACACAATGCACATTCAAGAAC	101
	Reverse	CCGAACCACAGACTTACAGTTT	
BLBP Primer 2	Forward	AAGTGGGAAACGTGACCAAAC	167
	Reverse	CAACCGAACCACAGACTTACAG	

Für die Auswertung der rt-PCRs braucht man nicht nur Primer für die gene of interest, sondern auch Primer für sogenannte „Housekeeping Gene“ (engl. für Haushaltsgen). Das sind Gene, die in allen Zellen exprimiert werden und die man als Bezugspunkt für die Genexpression anderer Gene verwenden kann. Da nicht alle Housekeeping Gene unter verschiedenen Experimentalbedingungen stabil exprimiert werden, muss für jedes Experiment ein geeignetes Housekeeping Gen gefunden werden. Klassische Housekeeping Gene sind HPRT (Tabelle 5), Beta Actin oder 18 S. Bis auf die Primer für Beta Actin waren bereits gute Primer in der Arbeitsgruppe Kipp etabliert. Die Primersequenzen der Housekeeping Gene sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10 Übersicht über die Primersequenzen der Housekeeping Gene

Housekeeping Gen		Primer-Sequenz (5'-3')	Länge des Amplikons [bp]
Beta Actin Primer 1	Forward	GTACCACCATGTACCCAGGC	247
	Reverse	AACGCAGCTCAGTAACAGTCC	
Beta Actin Primer 2	Forward	ACTGAGCTGCGTTTTACACCC	220
	Reverse	TGCTCCAACCAACTGCTGTC	
18 S	Forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA19	187
	Reverse	GCTGGAATTACCGCGGCT20	

Für die Bestimmung der idealen annealing temperature wird eine Standard-PCR mit einem Temperaturgradienten durchgeführt. Die von Sigma-Aldrich gelieferte Primer-Trockensubstanz wird nach Herstellerangaben in ultra-pure Wasser gelöst um eine Stammlösung mit 100 μM zu erhalten. Diese Stammlösung wird nochmal 1:10 mit ultra-pure Wasser verdünnt, so dass die Konzentration der Primerlösung 10 μM ist. Mit Ausnahme von SLC1A6 und SLC1A7 wurde für die Bestimmung der annealing temperature als cDNA eine 25% cDNA-Stammlösung aus dem Cortex einer gesunden Maus verwendet. Die annealing temperature von SLC1A6 wurde mit der cDNA aus dem Cerebellum und von SLC1A7 mit cDNA aus dem Auge einer gesunden Maus bestimmt. Für die Primer-Paare von SLC1A1 ist die annealing temperature ähnlich zu der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Standard-PCR bestimmt worden.

Tabelle 11 Verwendete Chemikalien für die Standard-PCR

Reagenz	Firma	Bestellnummer
10X PCR Puffer ohne Mg	Thermo Fischer Sci	Y02028
50 mM MgCl ₂	Bioline	BIO-37026
dNTP Mix 10 mM	Bioline	BIO-39044
Taq-Polymerase: Biotaq	Bioline	21040
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo Fischer Sci	10977

Die Proben und Reagenzien werden aufgetaut, mit dem Vortex-Mischer gemischt und kurz zentrifugiert. Währenddessen wird der Mastermix hergestellt und die benötigten Eppendorf-Gefäße mit einem schwarzen Stift beschriftet. Dieser wird für die untersuchte Primer-Paare im Überschuss mit den in Tabelle 12 angegebenen Volumina pipettiert.

Tabelle 12 Volumenangaben des Mastermix für die Bestimmung der annealing temperature von SLC1A1

Reagenz:	Volumen:
Up-H ₂ O	9.3 μ l
10X PCR Puffer	1.25 μ l
MgCl ₂	0.38 μ l
dNTPs 10 mM	0.25 μ l
Forward-Primer	0.25 μ l
Reverse-Primer	0.25 μ l
Taq Polymerase	0.08 μ l
cDNA (25%)	2.0 μ l

Der Mastermix wird im Überschuss für n+2 Proben hergestellt, wobei n die Anzahl der getesteten Temperaturen ist. Anschließend wird der Mastermix ohne Verwendung des Vortex-Mischers gemischt, kurz zentrifugiert und es werden je 13.50 μ l in die vorbereiteten Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die Proben werden kurz zentrifugiert und das entsprechend Tabelle 13 angegebene PCR-Programm im Thermocycler ausgewählt und die PCR gestartet. Die Proben werden auch hier erst in das Gerät gestellt, nachdem es auf 96 °C vorgeheizt ist. Zur Etablierung des Primer-Paares werden verschiedene Temperaturen verwendet (51.7 °C, 53.6 °C, 55.7 °C, 57.9 °C, 60.1 °C, 62.3 °C, 64.4 °C, 66.3 °C) umso die ideale annealing temperature zu bestimmen. Dabei werden die Schritte zwei bis vier 30-mal wiederholt.

Tabelle 13 PCR-Programm für die Bestimmung der annealing temperature von SLC1A1

Schritt:	Temperatur: [°C]	Zeit: [sek]
1	95	180
2	95	40
3	50-68	40
4	72	45
5	72	45
6	10	

← 30x

Für die restlichen Primer-Paare wurde die Etablierung der annealing temperature mit dem SensiMix von BIOLINE durchgeführt, einem Fertig-Mix für rt-PCR.

Tabelle 14 Verwendete Chemikalien für die Etablierung der annealing temperature mit SensiMix™

Reagenz	Firma	Bestellnummer
SensiMix™ SYBR® & Fluorescin KIT	BIOLONE	QT615-05
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo Fischer Sci	10977

Die benötigten Reagenzien und Proben werden aufgetaut, mit dem Vortex-Mischer kurz gemischt und zentrifugiert. Parallel dazu wird der Mastermix hergestellt und die benötigten Eppendorf-Gefäße mit einem schwarzen Stift beschriftet. Der Mastermix wird für jedes untersuchte Primer-Paar im Überschuss mit den in Tabelle 15 angegebenen Volumina pipettiert.

Tabelle 15 Verwendete Volumina für die Etablierung der Primer mit SensiMix

Reagenz:	Volumen:
SensiMix™	5.0 µl
Up-H ₂ O	2.0 µl
Forward-Primer	0.5 µl
Reverse-Primer	0.5 µl
cDNA	1.0 µl

Auch hier wird der Mastermix im Überschuss für n+2 Proben hergestellt, wobei n wieder die Anzahl der getesteten Temperaturen ist. Der fertige Mastermix wird ohne Verwendung des Vortex-Mischers gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend je 9 µl in das entsprechende Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proben werden kurz zentrifugiert und das entsprechend Tabelle 16 angegebene Programm ausgewählt und

die PCR gestartet. Zur Etablierung des Primer-Paares werden wieder verschiedene Temperaturen verwendet (51.5 °C, 53.5 °C, 55.7 °C, 57.9 °C, 60.1 °C, 62.3 °C, 64.5 °C, 66.5 °C). Die Schritte zwei bis vier des PCR-Programms werden 30-mal wiederholt.

Tabelle 16 PCR-Programm für die Bestimmung der annealing temperature von SLC1A1

Schritt:	Temperatur: [°C]	Zeit:
1	95	10 min
2	95	30 sek
3	50-68	60 sek
4	72	60 sek
5	72	2 min
6	4	10 min

← 30x

Für beide Methoden wird im Anschluss eine Gel-Elektrophorese wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben durchgeführt. Die annealing-temperature wird dann rein qualitativ nach Intensität der Fluoreszenz-Bande im UV-Licht bestimmt. Für die weiteren Experimente wird auch nur das Primer-Paar verwendet, bei dem bei der Bestimmung der annealing-temperature intensivere Banden nachweisbar sind. Die ermittelten annealing-temperature sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Für die Primer für SLC1A7 sowie für den Primer Nummer 2 für SLC1A1 konnten keine Banden in der Gelelektrophorese detektiert werden.

Tabelle 17 Annealing temperatures der Primer-Paare der gene of interests.

Primer	Verwendetes Gewebe	T _A [°C]
SLC1A1 Primer 1	Cortex	60
SLC1A1 Primer 2	Cortex	Keine Bande
SLC1A2 Primer 1	Cortex	60
SLC1A2 Primer 2	Cortex	60
SLC1A3 Primer 1	Cortex	60
SLC1A3 Primer 2	Cortex	60
SLC1A6 Primer 1	Cerebellum	58
SLC1A6 Primer 2	Cerebellum	60
SLC1A7 Primer 1	Auge	Keine Banden

Tabelle 17 Fortsetzung

Primer	Verwendetes Gewebe	T _A [°C]
SLC1A7 Primer 2	Auge	Keine Banden
GFAP Primer 1	Cortex	62
GFAP Primer 2	Cortex	64
ALDH1L1 Primer 1	Cortex	60
ALDH1L1 Primer 2	Cortex	62
S100 beta Primer 1	Cortex	62
S100 beta Primer 2	Cortex	60
Vimentin Primer 1	Cortex	62
Vimentin Primer 2	Cortex	60
BLBP Primer 1	Cortex	60
BLBP Primer 2	Cortex	58
Beta Actin Primer 1	Cortex	60
Beta Actin Primer 2	Cortex	60
18 S	Cortex	60

3.1.6 Real-time PCR

Im Gegensatz zur Standard-PCR, einer Endpunkt-PCR, bei der im Anschluss eine Gel-Elektrophorese durchgeführt werden muss, erlaubt die real-time PCR (rt-PCR) die Quantifizierung des Amplikons parallel während der Amplifizierung. Es gibt zwei gebräuchliche Methoden zur Bestimmung der Produkte während der rt-PCR: zum einen die Verwendung unspezifischer Fluorophore die in beliebige doppel-strang DNA interkalieren und zum anderen sequenz-spezifische DNA-Sonden, die mit einem Fluorophor markiert sind, der nur nachweisbar ist, wenn die DNA-Sonde an das komplementäre PCR-Produkt gebunden hat. In dieser Arbeit wird für die real-time PCR die SYBR-Green Methode verwendet um das Amplikon während der rt-PCR zu quantifizieren. SYBR-Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an doppel-strang DNA bindet und durch blaues Licht der Wellenlänge 497 nm angeregt wird und daraufhin grünes Licht der Wellenlänge 520 nm emittiert. Die Vorteile von SYBR-Green sind seine physikochemische Stabilität, d.h. es kann sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Temperaturen verwendet werden. Außerdem ist die Bindung an den

DNA-Doppelstrang nicht kovalent wodurch die meisten Nukleasen und DNA-Polymerasen in ihrer Aktivität nicht gestört werden.

An dieser Stelle soll noch betont werden, dass die Quantifizierung der rt-PCR in dieser Arbeit nicht absolut, sondern semi-quantitativ erfolgt ist. Es wird eine interne Standard-Kurve gemessen und das relative Genexpressionslevel zu bestimmen. Dazu wird die cDNA aus allen im Experiment verwendeten Proben vereinigt und als 100% Standard definiert. Dieser wird dann siebenmal 1:2 verdünnt und somit eine Standard-Verdünnungsreihe erhalten: 100% - 50% - 25% - 12.5% - 6.25% - 3.125% - 1.5626%.

Für die Vorbereitung einer rt-PCR wird bei 0 °C gearbeitet. Außerdem ist penibel darauf zu achten keine fremd-DNA in die Proben zu verschleppen.

Tabelle 18 Verwendete Chemikalien für die Etablierung der annealing temperature mit SenisMix™

Reagenz	Firma	Bestellnummer
SensiMix™ SYBR® & Fluorescin KIT	BIOLONE	QT615-05
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo Fischer Sci	10977
Primer (Forward und Reverse)		

Die benötigten Reagenzien und Proben werden aufgetaut, mit Ausnahme des SenisMix mit dem Vortex-Mischer gemischt und kurz zentrifugiert. Parallel dazu wird ein Eppendorf-Gefäß für den Mastermix und die 96-Well-Platte mit einem schwarzen Stift beschriftet. Der Mastermix wird im Überschuss mit den in Tabelle 19 angegebenen Volumina pipettiert, ohne Verwendung des Vortex-Mischers gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend werden jeweils 8 µL des Mastermix in die benötigten Vertiefungen der 96-Well-Platte pipettiert.

Tabelle 19 Benötigte Volumina für den Mastermix der rt-PCR

Reagenz:	Volumen:
SensiMix™	5.0 µl
Up-H ₂ O	2.0 µl
Forward-Primer	0.5 µl
Reverse-Primer	0.5 µl

Für die weiteren Pipettierschritte werden die Pipettenspitzen einer vollen Pipettenspitzenbox in der gleichen Reihenfolge verwendet, wie die Proben in die 96-Well-Platte pipettiert werden. In jede Vertiefung werden 2 µL der entsprechenden

cDNA bzw. UP-Wasser als Negativkontrolle (NK) analog zum Pipettierschema gegeben. Die 96-Well-Platte wird mit Plastikfolie verschlossen, kurz zentrifugiert und das PCR-Programm (Tabelle 20) gestartet.

Tabelle 20 PCR-Programm für die rt-PCR

Schritt:	Temperatur: [°C]	Zeit:
1	95	10 min
2	95	15 sek
3	T _A	30 sek
4	72	30 sek
5	95	1 min
6	44	30 sec
7	95	1 min



Die Schritte 2-4 werden mehrere Male wiederholt und im Anschluss eine Schmelzkurve des PCR-Amplikons bestimmt. Nach Ende der rt-PCR wird mit den Proben einer Reihe der 96-Well-Platte eine Gel-Elektrophorese nach Kapitel 3.1.4 durchgeführt. Durch Bestimmung der Schmelzkurve und der Durchführung der Gel-Elektrophorese wird sichergestellt, dass nur ein PCR-Produkt entstanden ist, das auch die erwartete Basenpaar-länge hat.

3.1.7 Auswertung rt-PCR

Es gibt zwei gebräuchliche Methoden um die erhaltenen Daten einer rt-PCR auszuwerten: die absolute und die relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird die während der PCR gebildete Menge an cDNA-Kopien in Bezug zu einer externen Standardkurve mit bekannten cDNA Konzentrationen gesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch eine relative Quantifizierung angewandt. Der Gehalt an cDNA wird mit dem PCR-Programm qPCRsoft (qPCRsoft 3.2, Analytik Jena AG) ermittelt, die relativen Mengen des mRNA-Transskripts mit der doppel-delta CT-Methode^[57] berechnet und auf die relativen Mengen des mRNA-Transskripts eines Housekeeping Gens normiert. Die stabile Genexpression des Housekeeping Gens ist vorher getestet worden. Diese rechnerischen Schritte sind notwendig um den Fehler der Auswertung zu minimieren, da z.B. 1 µg der isolierten RNA nur 8-10% an mRNA enthält.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Immunhistochemische Färbungen

In dieser Arbeit wurden zur Darstellung des astrozytären Intermediärfilaments GFAP und der Aldehyddehydrogenase ALDH1L1 Antikörperfärbungen durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein immunhistochemisches Verfahren bei dem das Antigen durch Verwendung von zwei Antikörpern durch folgendes Prinzip indirekt nachgewiesen wird:

1. Ein Antikörper, der sogenannte Primärantikörper, (mono- oder polyklonal) bindet an das Epitop des gesuchten Antigens im Gewebe.
2. Ein zweiter Antikörper, der sogenannte Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist bindet an den Primärantikörper.
3. Durch anregen des Fluoreszenzfarbstoffs des Sekundärantikörpers mit monochromatischem Licht kann die Fluoreszenz nachgewiesen werden und die Bindung des Primärantikörpers ist somit durch Nachweis des Sekundärantikörpers indirekt nachgewiesen.

3.2.2 Puffer und Blockseren

Benötigte Puffer und Seren für die Immunhistochemie:

Phosphat-Puffer (PBS) pH = 7.4:

477.75 g PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Biochrom-L 182-50) in insgesamt 5 L destilliertem Wasser lösen, den pH auf 7.4 Einstellen und die so hergestellte Stammlösung nochmal 1:10 verdünnen

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ethylendiamintetraessigsäure Puffer (Tris-EDTA):

6.06 g Tris (Pufferan ®; Roth A-1086) und 1.85 g EDTA (Fluka – 03685) in insgesamt 5 L destilliertem Wasser lösen und den pH auf 9.0 einstellen

0.5% Triton / PBS:

10%ige Lösung aus Triton X-100 (Sigma T6878) in PBS, nochmal 1:20 mit PBS verdünnt

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung A:

10 mg Bisbenzimid (Sigma 14530) in 1 ml destilliertem Wasser lösen

DAPI-Lösung B:

DAPI-Lösung A 1: 1000 verdünnen, d.h. 1 μl DAPI-Lösung in 999 μl destilliertem Wasser lösen.

DAPI-Arbeitslösung:

DAPI-Lösung B nochmal 1:10 verdünnen, d.h. 50 μl DAPI-Lösung B in 450 μl destilliertem Wasser lösen

3.2.3 Einfache Immunfluoreszenzfärbung

Das Färben der auf Objektträgern fixierten histologischen Schnitte folgt immer dem gleichen standardisierten Protokoll. Bevor mit der Färbung begonnen werden kann, müssen die in Paraffin eingebetteten und in PFA konservierten Schnitte zuerst durch Behandlung mit Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe wieder rehydriert werden (Tabelle 21)

Tabelle 21 Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Rehydrierung histologischer Schnitte

Schritt	Lösungsmittel	Zeit [min]
1	Xylol I	10
2	Xylol II	10
3	Xylol III	10
4	Xylol / Ethanol 1:1	5
5	Ethanol 100%	3
6	Ethanol 100%	3
7	Ethanol 96%	3
8	Ethanol 96%	3
9	Ethanol 70%	3
10	Ethanol 50%	3
11	Destilliertes Wasser	3

Während der Fixierung des Gewebes durch Formaldehyd und der Einbettung in Paraffin kann es zur Maskierung der Epitope kommen, die das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung beeinträchtigen können. Um die Epitope für Antikörper wieder zugänglich zu machen, wurden die Schnitte für 10 Minuten mit Hilfe einer Mikrowelle in Tris-EDTA-Puffer gekocht. Dabei handelt es sich um ein „heat induced epitope retrieval“ (HIER-Methode). Danach werden die Schnitte innerhalb von 15 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Um die einzelnen Gewebeschnitte herum

wird dann mit einem Fettstift eine hydrophobe Barriere aufgebracht, die verhindert, dass die aufgetropften Reagenzien vom Objektträger fließen. Die immunhistochemischen Färbungen der vorbereiteten Schnitte erfolgen dann nach dem in Tabelle 22 angegebenen allgemeinen Färbeprotokoll. Dabei werden die Arbeitsschritte in einer feuchten Kammer ausgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte während der Färbung zu verhindern. Außerdem werden die Schnitte nach dem Spülen in PBS durch Aufbringen von je 100 μ l 5% Normal Goat Serum in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um so eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern bzw. zu minimieren. Das Normal Goat Serum wird danach von den Objektträgern abgeklopft und der vorbereitete Primärantikörper (je 100 μ l) aufgebracht. Der Primärantikörper wird dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Primärantikörper von den Schnitten vorsichtig abgetropft und diese dreimal für je fünf Minuten in PBS gespült. Danach wird der vorbereitete Sekundärantikörper aufgebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Nach dreimaligem Spülen in PBS für je fünf Minuten werden die Zellkerne dann mit DAPI gegengefärbt. Dazu werden die Schnitte mit je 100 μ L der DAPI-Arbeitslösung benetzt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in destilliertem Wasser für je fünf Minuten werden die Schnitte dann mit FluorPreserve Reagenz eingedeckt. Die Objektträger werden dann, um ein optimales Ergebnis zu erhalten, mit Gewichten beschwert und über Nacht in Dunkelheit getrocknet.

Tabelle 22 Allgemeines Färbeprotokoll für einfache Immunfluoreszenzfärbung

Schritt	Beschreibung	Zeit
Blocken	Dreimaliges Spülen in PBS unter leichtem Schütteln	je 5 min
	Aufbringen von 5% Normal-Goat-Serum	
	Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur	1 h
Inkubation Primärantikörper	Schnitte leicht abtropfen	
	Aufbringen des Primärantikörpers	
	Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4 °C	Über Nacht
Spülen	Schnitte leicht abtropfen	
	Dreimaliges Spülen in PBS unter leichtem Schütteln	je 5 min
Inkubation Sekundärantikörper	Aufbringen des Sekundärantikörpers	
	Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und in Dunkelheit	1 h
Spülen	Dreimaliges Spülen in PBS unter leichtem Schütteln	je 5 min
Gegenfärbung mit DAPI	Aufbringen der DAPI-Lösung	
	Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und in Dunkelheit	5 min
Spülen	Zweimaliges Spülen in destilliertem Wasser unter leichtem Schütteln	je 5 min
Eindecken	Fixieren der Schnitte in FluorPreserve Reagenz	
	Beschweren der Schnitte mit Gewichten und trocknen	Über Nacht

Die für die Färbungen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 23 bzw. Tabelle 24 angegeben.

Tabelle 23 Verwendete Primärantikörper für die einfache Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Verdünnung ^{a)}	Wirt	Klon	Firma	Bestellnummer
Anti-ALDH1L1	1:1.000	Hase	Polyklonal	Abcam	ab87117
Anti-GFAP	1:1.000	Huhn	Polyklonal	Abcam	ab4674

^{a)} Verdünnt mit 5% Normal Goat Serum

Tabelle 24 Verwendete Sekundärantikörper für die einfache Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Verdünnung ^{a)}	Firma	Bestellnummer
Alexa Fluor goat anti-rabbit 488	1:200	Life Technologies	A-11008
Alexa Fluor goat anti-chicken 594	1:200	Life Technologies	A-11042

^{a)} Verdünnt mit 5% Normal Goat / Triton /PBS

3.2.4 Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung erfolgt im Prinzip analog wie die in Kapitel 3.2.2 beschriebene einfache Immunfluoreszenzfärbung. Der Unterschied besteht darin, dass sowohl beim Primär- als auch beim Sekundärantikörper nicht nur ein Antikörper, sondern zwei Antikörper, angesetzt in einem Mastermix, aufgetragen werden. Die verwendeten Antikörper und Konzentrationen sind identisch mit denen von Tabelle 25 bzw. 26. Für die Immundoppelfärbung wurden vier Schnitte von Kontrolltieren und fünf Schnitte von Tieren nach fünf Wochen Behandlung mit Cuprizone gefärbt. Die Schnitte sind vom Arbeitskreis Kipp zur Verfügung gestellt worden. Von den Schnitten der behandelten Tiere waren nur vier Schnitte verwertbar. Alle Schnitte stammten aus der im Histologieatlas von Sidman et al. definierten Region 275.^[58]

3.2.5 Auswertung Immunhistochemie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Veränderung der Genexpression von Astrozyten im Cuprizone-Modell untersucht. Bei den Astrozyten-Markern GFAP und ALDH1L1 ist dieser Aspekt mit PCR auf Transkriptionsebene und immunhistochemisch auf Translationsebene untersucht worden. Dabei war es von Interesse ob sich Unterschiede zwischen grauer und weißer Substanz des Gehirns nachweisen lassen. Vor der Auswertung wurden deshalb „regions of interest“ (engl. für Region von Interesse) der verschiedenen Bereiche aus Region 275 des Gehirns definiert. Diese sind für die Bereiche der weißen Substanz das Corpus Callosum (CC) und die Capsula Interna (CI). Für die Bereiche der grauen Substanz sind es der Cortex (Cx) und der Hippocampus (HC). Weiterhin wurden der Thalamus (TH), der Hypothalamus (HT), die

Habenulae (HB) und die Fimbriae (FB) in die Auswertung miteinbezogen (Abbildung 5).

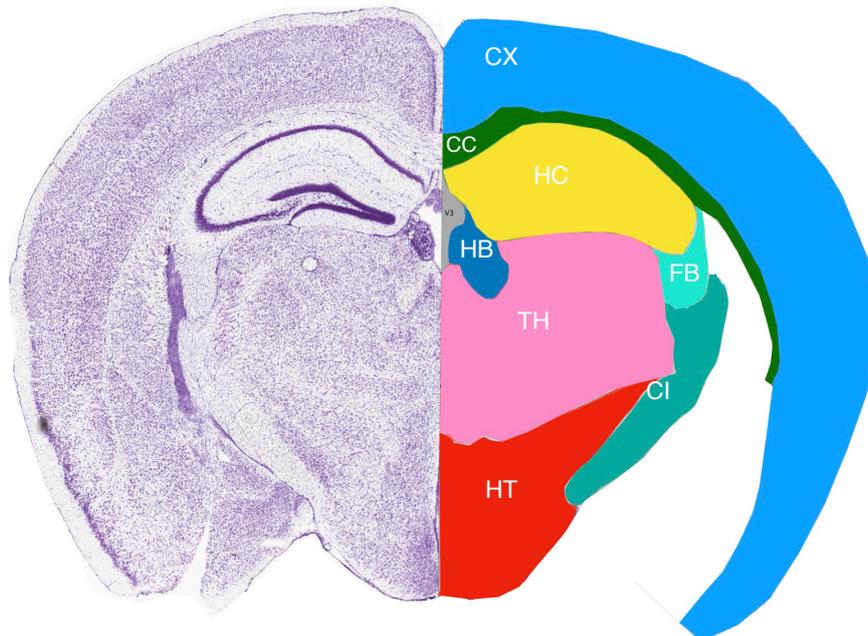


Abbildung 5 Regions of interests der Doppelfluoreszenzfärbungen. Corpus Callosum (CC), Capsula Interna (CI), Cortex (Cx), Hippocampus (HC), Thalamus (TH), Hypothalamus (HT), Habenulae (HB) und Fimbriae (FB)

Um die Schnitte untersuchen zu können wurden diese mit einem konfokalen Mikroskop (Olympus BX51WI mit Olympus BX-DSU und SOLA LED Lampe, Programm: Stereoinvestigator 11.02.01) bei 40-facher Vergrößerung digitalisiert, wobei alle Schnitte für ideale Vergleichbarkeit mit denselben Belichtungsbedingungen digitalisiert wurden: Die DAPI-Kernfärbung bei einer Exzitationswellenlänge von 350 nm und einer Belichtungszeit der Kamera von 104.880 ms, der Alexa Fluor goat anti-chicken Antikörper mit einer Exzitationswellenlänge von 594 nm und einer Belichtungszeit der Kamera von 181.420 ms und der Alexa Fluor goat anti-rabbit Antikörper mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Belichtungszeit der Kamera von 42.960 ms. Die Scans wurden dann mit dem Programm Neurolucida 11 (mbf BIOSCIENCE Version 11.01.2) bearbeitet, so dass ein Bild erstellt wurde, an dem alle drei Wellenlängen sichtbar waren, ein Bild in dem nur die rote Fluoreszenz dargestellt war und ein Bild in dem nur die grüne Fluoreszenz dargestellt war. Die Bilder wurden dann im Format JPEG gespeichert und mit Hilfe des Programms ImageJ (Version 1.50i für Windows, National Institute of Health, USA) ausgewertet. Dazu wurden im Gesamtbild, das heißt mit allen angeregten Farben, (Abbildung 6 **A**), die regions of interest umfahren, wobei nur jeweils die Hälfte eines Schnittes ausgewertet wurde (Abbildung 6, **B**). Für die Auswertung der Fluoreszenz wurden die so definierten regions of interest

einmal über das identische Bild in dem nur die grüne Fluoreszenz dargestellt war (Abbildung 6, **C**) und in dem nur die rote Fluoreszenz dargestellt war (Abbildung 6 **D**) gelegt und die Intensität bestimmt. Dies erfolgte sowohl für die Schnitte der Kontrolltiere als auch für die Schnitte der Tiere nach fünf Wochen Behandlung mit Cuprizone.

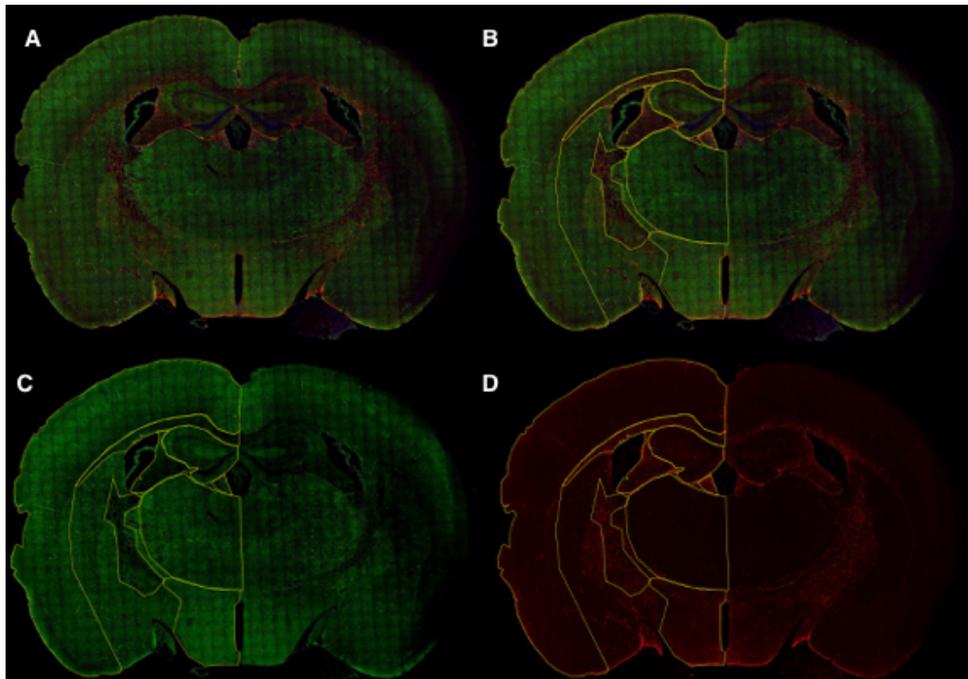


Abbildung 6 Scan der Immunfluoreszenzdoppelfärbung. **A:** das Originalbild. **B:** das Originalbild mit den markierten regions of interest. **C:** Fluoreszenzeinzelbild mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und den regions of interest aus dem Originalbild. **D:** Fluoreszenzeinzelbild mit einer Exzitationswellenlänge von 598 nm und den regions of interests aus dem Originalbild.

Die erhaltenen Messdaten der Fluoreszenzintensität wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 8.3.0 für Mac Os X, GraphPad, Software Inc. San Diego CA, USA) statistisch verglichen.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem mit dem Programm GraphPad Prism (Version 8.3.0 für Mac Os X, GraphPad, Software Inc. San Diego CA, USA).

3.3.1 Statistische Auswertung der Versuche zur Veränderung der Genexpression der Glutamattransporter EAAT1-4

Für die Versuche wurden die Gehirne von jeweils fünf Kontrolltieren ohne Behandlung sowie nach einer, drei und fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone verwendet. Die Versuche wurden in Dupletts durchgeführt und der Mittelwert sowie der standard error of the mean (engl. für Standardabweichung, SEM) bestimmt.

Die Testergebnisse wurden mit einem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung überprüft. Bei EAAT1, EAAT3 und EAAT4 waren die Ergebnisse normalverteilt und als statistischer Test zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde zwischen den Ergebnissen der Kontrolltiere und denen der Tiere nach Cuprizone-Intoxikation jeweils eine One-Way-Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Dunnett post-hoc-Test durchgeführt. Für EAAT2 wurde die statistische Signifikanz mit einem Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunn's post-hoc Test für nicht-parametrische Daten überprüft. Signifikante Unterschiede in Bezug zu den Kontrolltieren sind durch * $p < 0.05$ gekennzeichnet.

3.3.2 Statistische Auswertung der Verteilung von ALDH1L1 und GFAP in der grauen und weißen Substanz des Gehirns nach Behandlung mit Cuprizone

Für die Versuche wurden Schnitte aus der Region 275 nach Sidman et. al verwendet. Es wurden 4 Schnitte von Kontrolltieren und 5 Schnitte von Tieren nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone verwendet. Bei den Schnitten der Kontrolltiere konnte einmal aufgrund von Luftblasen die Fluoreszenzintensität für den Hypothalamus und bei den Tieren nach fünf Wochen Cuprizone-Intoxikation einmal die Fluoreszenzintensität für den Thalamus nicht bestimmt werden. Für die Werte der Fluoreszenzintensität wurde jeweils der Mittelwert sowie der standard error of the mean (engl. für Standardabweichung, SEM) bestimmt.

Für die GFAP und ALDH1L1 Färbung wurden die erhaltenen Daten mit einem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung überprüft und Unterschiede zwischen Corpus Callosum und Cortex statistisch unter Verwendung des Welch's t-Test auf Signifikanz geprüft. Statistisch signifikante Unterschiede in Bezug zur Kontrollgruppe sind durch * $p < 0.05$ gekennzeichnet.

3.3.3 Veränderung des Genexpressionsmusters von Astrozyten in Cortex und Corpus Callosum nach Behandlung mit Cuprizone

Für die Versuche wurden aus Gehirnen von jeweils fünf Kontrolltieren ohne Behandlung sowie nach einer, drei und fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone der Cortex sowie das Corpus Callosum isoliert und analysiert. Die Versuche wurden in Dupletts durchgeführt und der Mittelwert sowie der standard error of the mean (engl. für Standardabweichung, SEM) bestimmt.

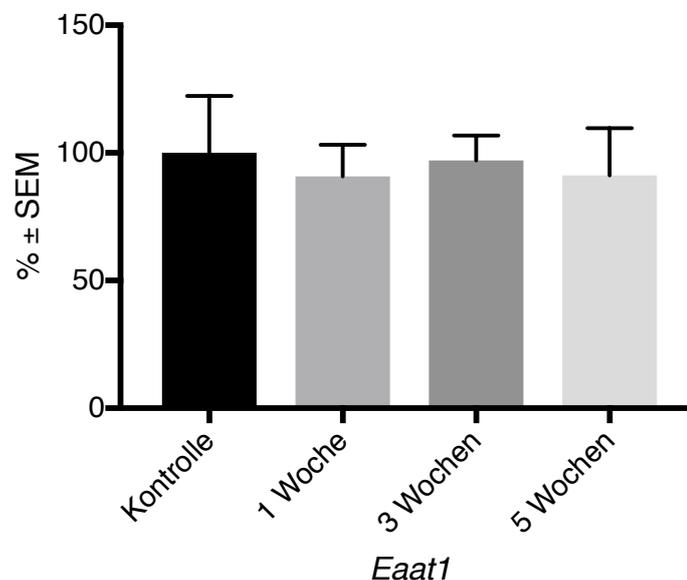
Die Testergebnisse wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Für S100 β und Vimentin waren die Werte für Cortex und Corpus callosum,

sowie für die Werte des Cortex bei BLBP nicht Normalverteilt. Als statistischer Test zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse von Cortex bzw. Corpus Callosum wurde für GFAP und ALDH1L1 zwischen den Ergebnissen der Kontrolltiere und denen der Tiere nach Cuprizone-Intoxikation eine One-Way-Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Dunnett post-hoc-Test durchgeführt. Für Vimentin, S100 β und BLBP wurde als statistischer Test zur Bestimmung der Signifikanz ein Kruskal-Wallis Test gefolgt von einem Dunn's post-hoc Test für nicht-parametrische Daten durchgeführt. Signifikante Unterschiede in Bezug zu den Kontrolltieren sind durch * $p < 0.05$ gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Veränderung der Genexpression der Glutamat-transporter EAAT1-4 im Cuprizone-Model

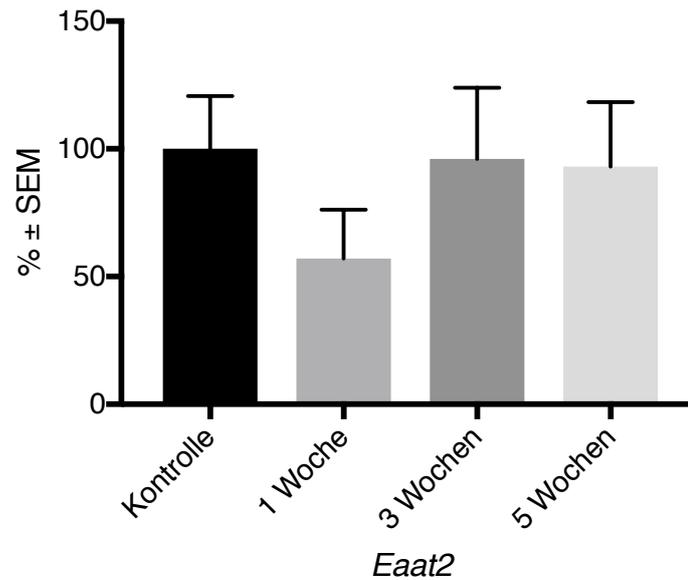
Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Glutamattransporter *Eaat1-4* in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Behandlung der Tiere mit 0.25% Cuprizone-Pulver sind im Folgenden dargestellt. Für *Eaat5* konnten keine Daten gewonnen werden, da es nicht gelungen ist einen validen Primer zu etablieren. Graph 1 zeigt die Ergebnisse für *Eaat1*:



Graph 1 Darstellung der Genexpressionsanalyse der Glutamattransporter *Eaat1* in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Fütterung mit Cuprizone.

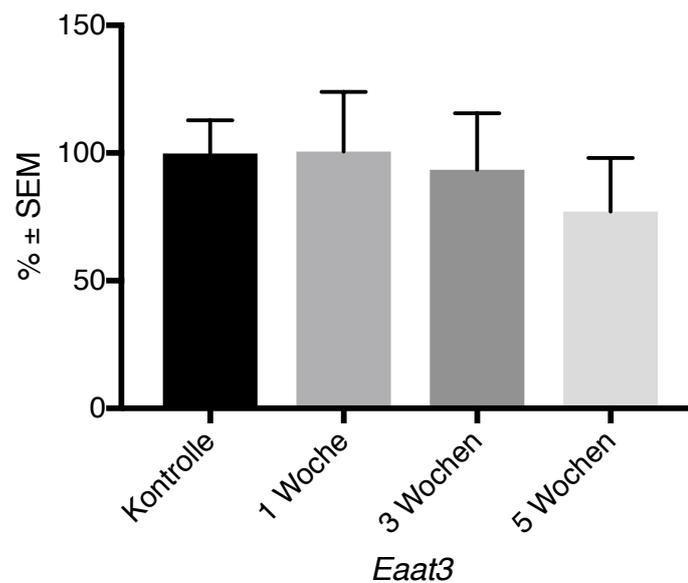
Die Expressionswerte von *Eaat1* waren zum Zeitpunkt Woche 1, im Vergleich zur Kontrollgruppe $91 \pm 6\%$ ($p < 0.71$), zum Zeitpunkt Woche 3 $97 \pm 4\%$ ($p < 0.98$), und zum Zeitpunkt Woche 5 $91 \pm 8\%$ ($p < 0.74$). Ein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von *Eaat1* im zeitlichen Verlauf konnte nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Genexpression von *Eaat2* sind im Graph 2 dargestellt. Die Expressionswerte von *Eaat2* waren zum Zeitpunkt Woche 1, im Vergleich zur Kontrollgruppe $57 \pm 9\%$ ($p < 0.08$), zum Zeitpunkt Woche 3 $96 \pm 13\%$ ($p > 0.99$), und zum Zeitpunkt Woche 5 $93 \pm 11\%$ ($p > 0.99$). Ein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von *Eaat2* im zeitlichen Verlauf konnte nicht beobachtet werden.



Graph 2 Darstellung der Genexpressionanalyse der Glutamatransporter *Eaat2* in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Fütterung mit Cuprizone.

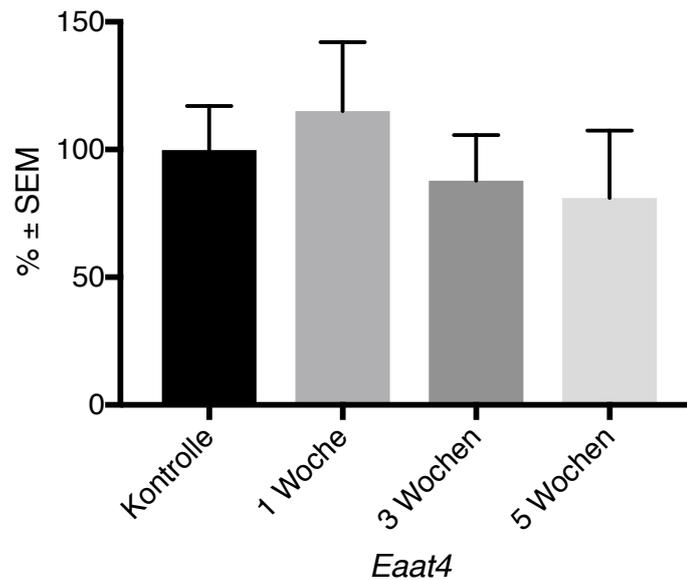
Die Ergebnisse der Genexpression von *Eaat3* sind im Graph 3 dargestellt.



Graph 3 Darstellung der Genexpressionanalyse der Glutamatransporter *Eaat3* in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Fütterung mit Cuprizone.

Die Expressionswerte von *Eaat3* waren zum Zeitpunkt Woche 1, im Vergleich zur Kontrollgruppe $101 \pm 10\%$ ($p < 0.99$), zum Zeitpunkt Woche 3 $93 \pm 10\%$ ($p < 0.92$), und zum Zeitpunkt Woche 5 $77 \pm 9\%$ ($p < 0.22$). Ein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von *Eaat3* im zeitlichen Verlauf konnte nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Genexpression von *Eaat4* sind im Graph 4 dargestellt.



Graph 4 Darstellung der Genexpressionanalyse der Glutamatttransporter *Eaat4* in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Fütterung mit Cuprizone.

Die Expressionswerte von *Eaat4* waren zum Zeitpunkt Woche 1, im Vergleich zur Kontrollgruppe $115 \pm 12\%$ ($p < 0.60$), zum Zeitpunkt Woche 3 $88 \pm 8\%$ ($p < 0.74$), und zum Zeitpunkt Woche 5 $81 \pm 12\%$ ($p < 0.44$). Ein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von *Eaat4* im zeitlichen Verlauf konnte nicht beobachtet werden.

4.2 Verteilung der astrozytären Biomarker ALDH1L1 und GFAP in der grauen und weißen Substanz nach Behandlung mit Cuprizone

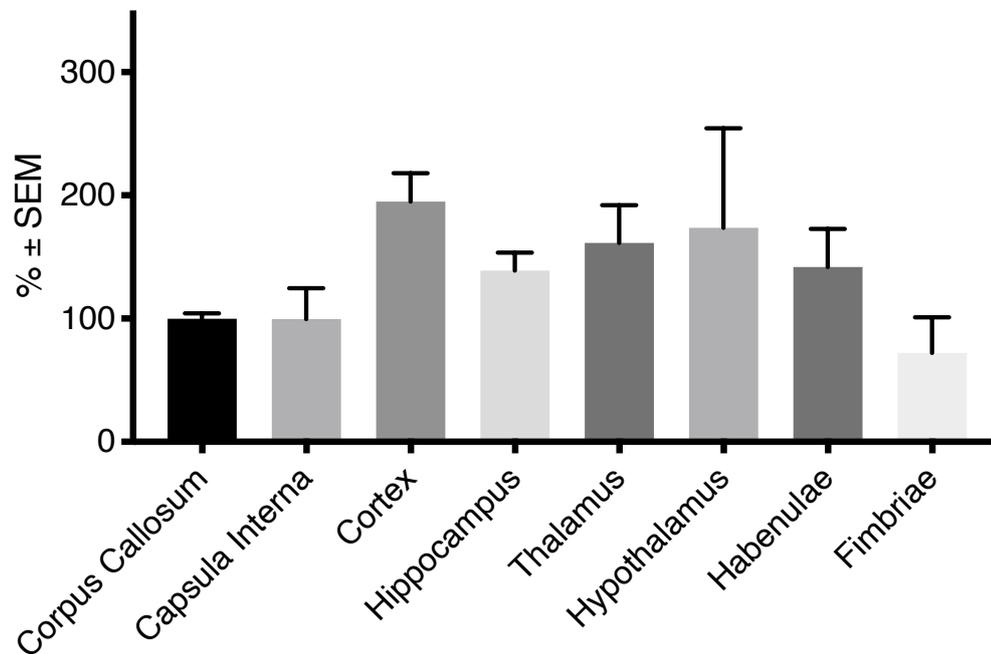
Es wurde die Verteilung von astrozytären Oberflächenproteinen in den Gehirnen von Kontrolltieren und bei Tieren nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation untersucht. Dies wurde durch eine Doppelfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen die Astrozytenmarkerproteine ALDH1L1 und GFAP untersucht. Ein direkter immunhistologischer Vergleich der Färbungen gegen ALDH1L1 bzw. GFAP ist jedoch nicht möglich.

4.2.1 Ergebnisse der Färbung mit einem Antikörper gegen ALDH1L1:

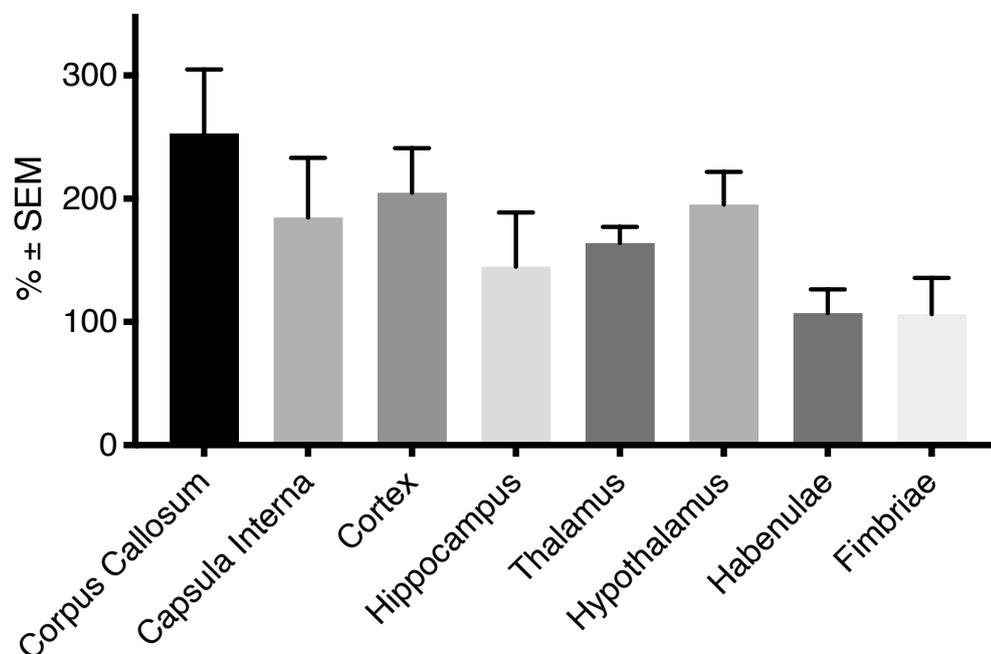
Es wurde das Expressionsniveau von ALDH1L1 in verschiedenen Gehirnregionen mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen untersucht. Die Intensität der Fluoreszenz, welche den indirekten Nachweis der Oberflächenexpression von ALDH1L1 visualisiert, wird sowohl für die Kontrolltiere als auch für die Tiere nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone in Relation zu der Fluoreszenzintensität das Corpus Callosum der Kontrolltiere gezeigt. Hierbei wurden die erhaltenen Werte für das Corpus Callosum der Kontrolltiere rechnerisch auf 100% festgelegt. Die Ergebnisse der

Antikörperfärbung gegen ALDH1L1 für die Kontrolltiere ist in Graph 5A und für die Tiere nach 5 Wochen Intoxikation mit Cuprizone in Graph 5B gezeigt.

A Antikörperfärbung gegen ALDH1L1 - Kontrolltiere



B Antikörperfärbung gegen ALDH1L1 – 5 Wochen Intoxikation



Graph 5 A: Prozentuale Darstellung der Fluoreszenzintensität der Antikörperfärbung gegen ALDH1L1 in den Kontrolltieren. Die Fluoreszenzintensität, die im Corpus Callosum der Kontrolltiere gemessen wurde ist zur besseren Vergleichbarkeit der Werte auf 100% normiert worden. Alle anderen Werte wurde in Relation dazu berechnet; **B:** Prozentuale Darstellung der Fluoreszenzintensität der Antikörperfärbung gegen ALDH1L1 nach fünf Wochen Behandlung mit Cuprizone.

In den Kontrolltieren zeigt sich mit $195\pm 12\%$ im Cortex die höchste Fluoreszenzintensität gefolgt von Hypothalamus ($174\pm 47\%$), Thalamus ($162\pm 15\%$) und Hippocampus ($139\pm 7\%$).

Die geringsten Färbeintensitäten wurden in den Fimbriae ($72\pm 14\%$) gemessen. Insgesamt finden sich also von allen mit in die Auswertung einbezogenen Gebiete grauer Substanz im Cortex und Hypothalamus die höchsten ALDH1L1 Expressionswerte. Für die weiße Substanz, d.h. Capsula interna, wurde eine ähnliche Färbeintensität (100 ± 13) gemessen wie auf das auf 100% normierte Corpus Callosum. Im Vergleich von Cortex und Corpus Callosum ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von ALDH1L1 ($p < 0.003$).

In den Tieren nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone zeigte sich höchste anti-ALDH1L1 Färbeintensität im Corpus Callosum ($253\pm 23\%$) gefolgt von Cortex ($205\pm 16\%$), Hypothalamus ($195\pm 12\%$), Capsula Interna ($185\pm 22\%$), Thalamus ($164\pm 7\%$) und Hippocampus ($145\pm 20\%$). In den Fimbriae (106 ± 13 und Habenulae ($107\pm 13\%$) wurden niedrigere Werte gemessen. Insgesamt finden sich nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone für ALDH1L1 höhere Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Vergleich von Cortex und Corpus Callosum ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von ALDH1L1.

Zur besseren Vergleichbarkeit der gemessenen Fluoreszenzwerte von Kontrolle und Cuprizone-Intoxikation sind diese nochmal in Tabelle 25 gegenübergestellt:

Tabelle 25 Zusammenfassung der Ergebnisse der Antikörperfärbung gegen ALDH1L1.

ROI	Kontrolltiere	5 Wochen Cuprizone
Corpus Callosum	100%	$253\pm 23\%$
Capsula Interna	$100\pm 13\%$	$185\pm 22\%$
Cortex	$195\pm 12\%$	$205\pm 16\%$
Hippocampus	$139\pm 07\%$	$145\pm 20\%$
Thalamus	$162\pm 15\%$	$164\pm 07\%$
Hypothalamus	$174\pm 47\%$	$195\pm 12\%$
Habenulae	$142\pm 16\%$	$107\pm 13\%$
Fimbriae	$72\pm 14\%$	$106\pm 13\%$

Beispiele für die untersuchten Schnitte für die Auswertung der Fluoreszenzintensität gegen ALDH1L1 für Kontrolltiere und für Tiere nach 5 Wochen Intoxikation mit Cuprizone sind in Abbildung 7 dargestellt. Dort lässt sich bereits rein qualitativ eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität für ALDH1L1 im Corpus Callosum nach 5 Wochen Intoxikation mit Cuprizone im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen (vgl. Abbildung 7 **B** vs. **D**).

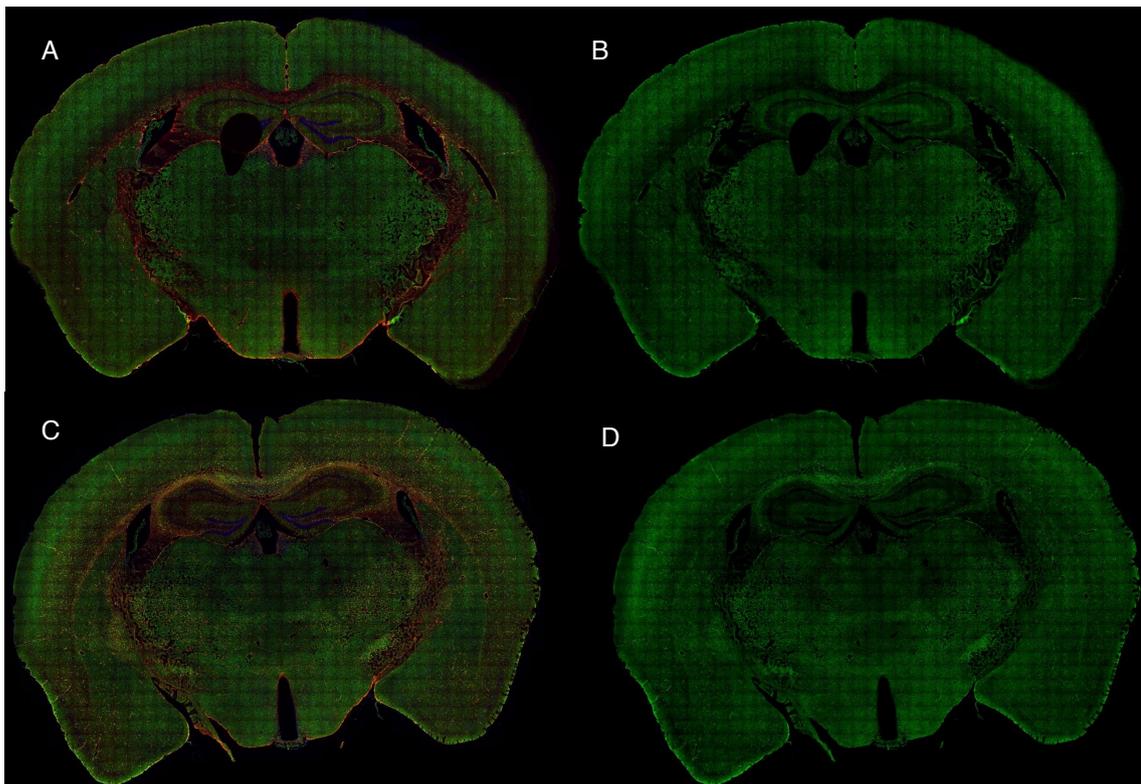
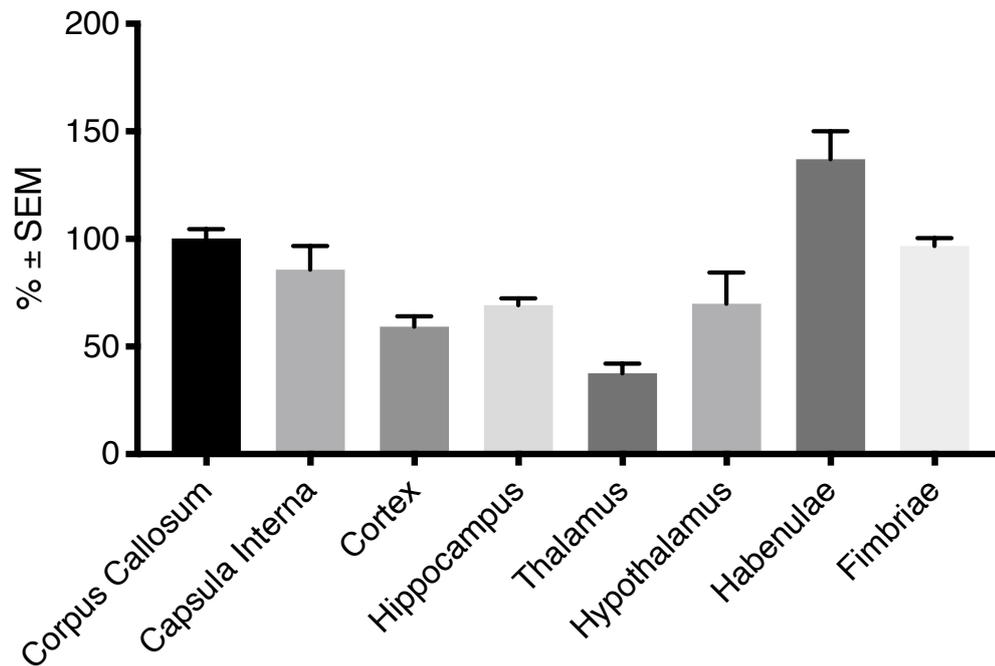
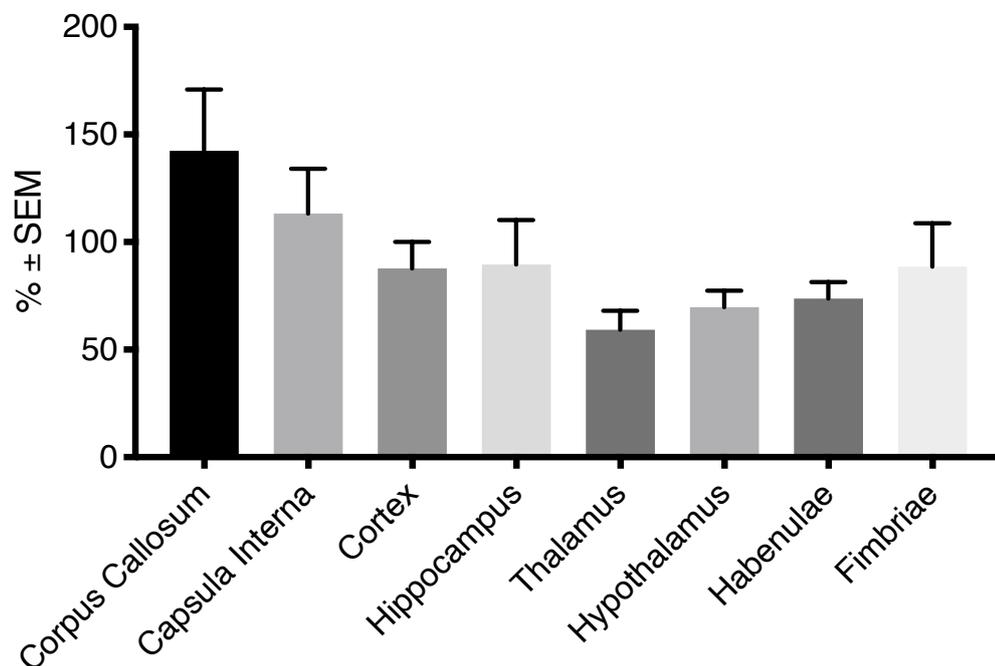


Abbildung 7 Scan der Immunfluoreszenzdoppelfärbung. **A**: Originalbild der Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines Kontrolltieres. **B**: Derselbe Schnitt wie in **A**, bei dem jedoch nur der Fluoreszenzfarbstoff des Antikörpers gegen ALDH1L1 angeregt wird. **C**: Originalbild der Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines Tieres nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone. **D**: Derselbe Schnitt wie in **C**, bei dem jedoch nur der Fluoreszenzfarbstoff des Antikörpers gegen ALDH1L1 angeregt wird.

4.2.2 Ergebnisse der Färbung mit einem Antikörper gegen GFAP:

GFAP ist ein gut etablierter Marker für vor allem aktivierte Astrozyten. Auch hier wurde die gemessene Intensität der Fluoreszenz für das Corpus Callosum der Kontrolltiere rechnerisch auf 100% festgelegt. Die Messergebnisse der Kontrolltiere sind in Graph 6A und für die Tiere nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone in Graph 6B dargestellt:

A Antikörperfärbung gegen GFAP - Kontrolltiere**B** Antikörperfärbung gegen GFAP – 5 Wochen Intoxikation

Graph 6A: Prozentuale Darstellung der Fluoreszenzintensität der Antikörperfärbung gegen GFAP in den Kontrolltieren. Die Fluoreszenzintensität, die im Corpus Callosum der Kontrolltiere gemessen wurde ist zur besseren Vergleichbarkeit der Werte auf 100% normiert worden. Alle anderen Werte wurde in Relation dazu berechnet; **B:** Prozentuale Darstellung der Fluoreszenzintensität der Antikörperfärbung gegen GFAP nach fünf Wochen Behandlung mit Cuprizone.

Die höchste anti-GFAP Färbeintensität in den Kontrolltieren konnte in den Habenulae festgestellt werden ($137 \pm 7\%$) gefolgt von den Fimbriae ($97 \pm 2\%$) und Capsula Interna

($86\pm 5\%$). Im Hippocampus ($69\pm 2\%$), dem Hypothalamus ($70\pm 8\%$) und Cortex ($59\pm 2\%$) wurden niedrigere Werte gemessen. Die niedrigste Fluoreszenzintensität wurde mit $38\pm 2\%$ für den Thalamus gemessen. Im Vergleich von Cortex und Corpus Callosum ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von GFAP ($p < 0.0001$).

Bei der Antikörperfärbung gegen GFAP in den Tieren nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone zeigte sich die höchste anti-GFAP Färbeintensität im Corpus Callosum mit $142\pm 14\%$ gefolgt von Capsula Interna ($113\pm 9\%$), Hippocampus ($90\pm 9\%$) sowie Cortex ($88\pm 5\%$) und in den Fimbriae ($89\pm 9\%$). In den Habenulae ($74\pm 3\%$), Hypothalamus ($70\pm 3\%$) und Thalamus ($59\pm 4\%$) wurden deutlich niedrigere Werte gemessen. Im Vergleich von Cortex und Corpus Callosum ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression von GFAP ($p < 0.009$).

Zur besseren Vergleichbarkeit der gemessenen Fluoreszenzwerte für GFAP von Kontrolle und Cuprizone-Intoxikation sind diese nochmal in Tabelle 26 gegenübergestellt:

Tabelle 26 Zusammenfassung der Ergebnisse der Antikörperfärbung gegen GFAP.

ROI	Kontrolltiere	5 Wochen Cuprizone
Corpus Callosum	100%	$142\pm 13\%$
Capsula Interna	$86\pm 5\%$	$113\pm 09\%$
Cortex	$59\pm 02\%$	$88\pm 06\%$
Hippocampus	$69\pm 02\%$	$90\pm 09\%$
Thalamus	$38\pm 02\%$	$59\pm 04\%$
Hypothalamus	$70\pm 08\%$	$70\pm 03\%$
Habenulae	$137\pm 07\%$	$74\pm 03\%$
Fimbriae	$97\pm 02\%$	$89\pm 09\%$

Im Vergleich lässt sich feststellen, dass im allgemein die Expression von GFAP nach 5 Wochen Intoxikation mit Cuprizone steigt. Lediglich im Hypothalamus bleibt sie annähernd gleich und in den Habenulae und Fimbriae sinkt sie.

Beispiele für die Untersuchten Schnitte für die Auswertung der Fluoreszenzintensität gegen GFAP für Kontrolltiere und für Tiere nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone sind in Abbildung 8 gezeigt.

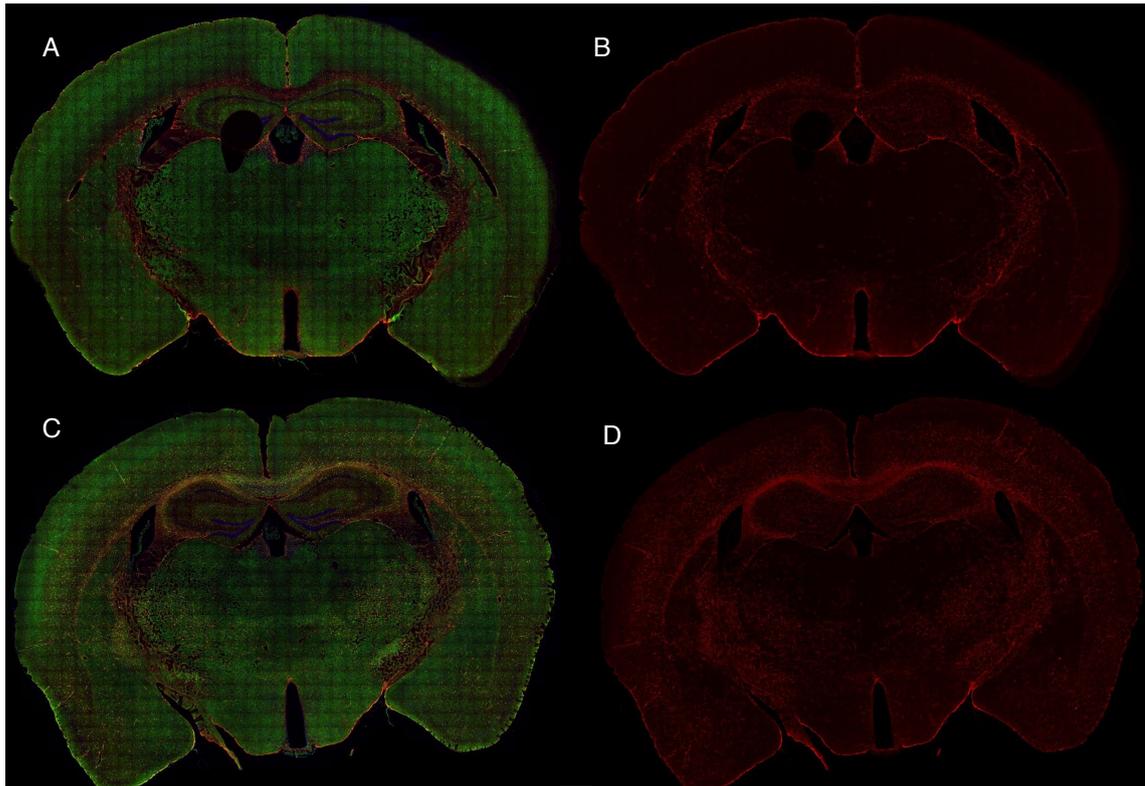


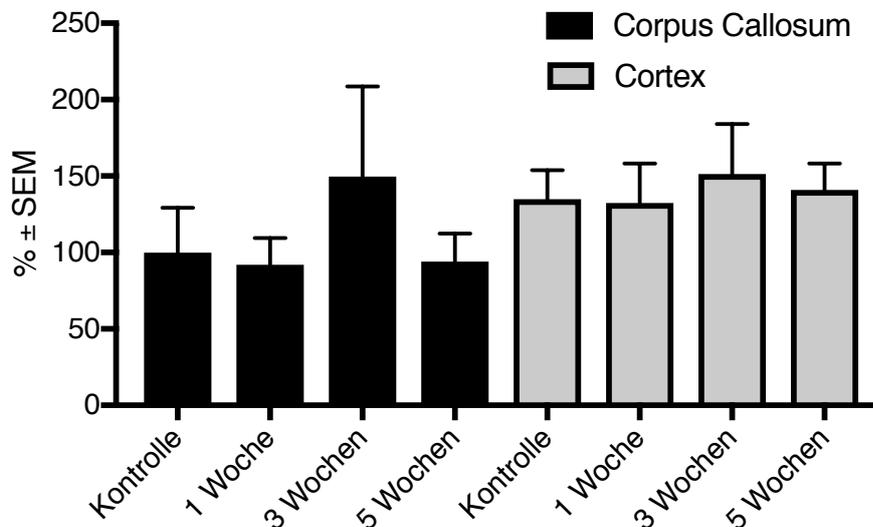
Abbildung 8 Scan der Immunfluoreszenzdoppelfärbung. **A:** Originalbild der Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines Kontrolltieres. **B:** Derselbe Schnitt wie in **A**, bei dem jedoch nur der Fluoreszenzfarbstoff des Antikörpers gegen GFAP angeregt wird. **C:** Originalbild der Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines Tieres nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone. **D:** Derselbe Schnitt wie in **D**, bei dem jedoch nur der Fluoreszenzfarbstoff des Antikörpers gegen GFAP angeregt wird.

4.3 Veränderung des Genexpressionsmusters von Astrozyten in Cortex und Corpus Callosum nach Cuprizone-Intoxikation

Die Veränderung des Genexpressionsmusters der Astrozyten wurde auch mit Hilfe der PCR untersucht. Stellvertretend für die graue Substanz wurde der Cortex und für die weiße Substanz das Corpus Callosum untersucht. Neben den Astrozytenmarkern *Gfap* und *Aldh111*, die bereits immunhistochemisch untersucht wurden, sind zusätzlich noch *S100 β* , *Vimentin* und *Blbp* analysiert worden. Die Werte der untersuchten gene of interest werden in Relation zum Corpus Callosum gezeigt. Hierzu wurden die erhaltenen Werte des untersuchten gene of interest für das Corpus Callosum rechnerisch auf 100% festgelegt.

4.3.1 ALDH1L1

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für *Aldh1l1* sind in Graph 7 dargestellt:



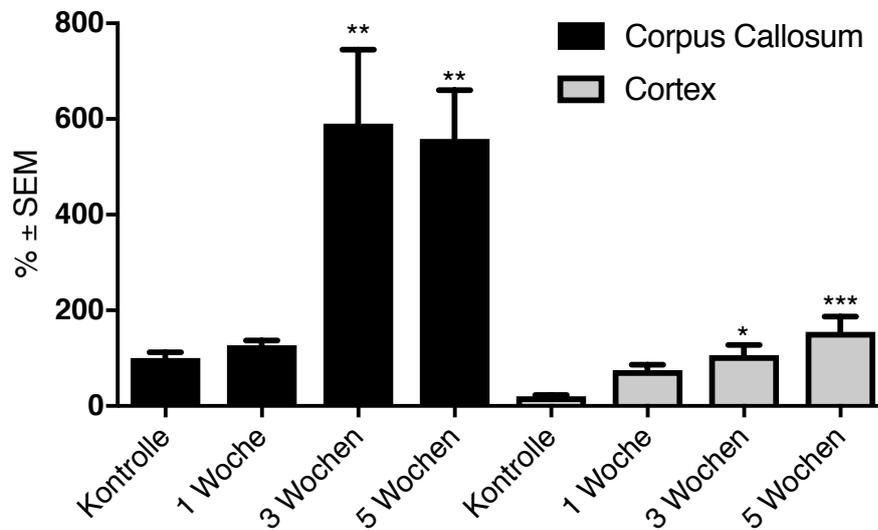
Graph 7 Darstellung der Genexpressionsanalyse von *Aldh1l1* in Corpus Callosum und Cortex in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone.

Im Corpus Callosum bleibt die Genexpression von *Aldh1l1* nach einer Woche nahezu unverändert ($92 \pm 8\%$), steigt dann nach drei Wochen etwas an ($150 \pm 26\%$) und fällt dann nach fünf Wochen wieder auf das Ausgangsniveau ab ($94 \pm 8\%$). Im Cortex lassen sich schon bei den Kontrolltieren höhere Genexpressionslevel an *Aldh1l1* messen ($135 \pm 9\%$), im zeitlichen Verlauf verändert sich die Genexpression nach einer Woche ($132 \pm 12\%$), drei Wochen ($151 \pm 15\%$) und fünf Wochen ($141 \pm 8\%$) nur geringfügig. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Corpus Callosum und Cortex konnte nicht beobachtet werden.

4.3.2 GFAP

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sind im Graph 8 dargestellt. Im Corpus Callosum bleibt die Genexpression von *Gfap* nach einer Woche nahezu konstant ($127 \pm 10\%$). Nach drei Wochen Intoxikation mit Cuprizone steigt sie dann stark an ($590 \pm 154\%$) und bleibt dann auch nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone erhöht ($558 \pm 102\%$). Der Unterschied der Genexpression von *Gfap* im Corpus Callosum zwischen Kontrolltieren und nach drei bzw. fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone ist statistisch signifikant. Im Cortex ist das Genexpressionslevel von *Gfap* bei den Kontrolltieren sehr niedrig ($20 \pm 3\%$), steigt aber dann im Verlauf kontinuierlich an, d.h. nach einer Woche Intoxikation mit Cuprizone $75 \pm 11\%$, nach drei Wochen $106 \pm 22\%$ und nach fünf Wochen $155 \pm 32\%$. Der Unterschied der Genexpression von *Gfap* im

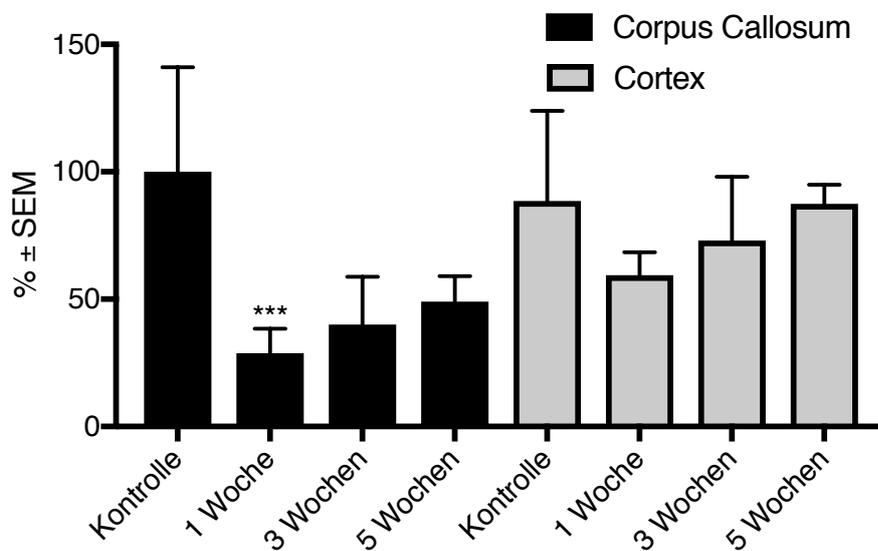
Cortex zwischen Kontrolltieren und nach drei bzw. fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone ist statistisch signifikant.



Graph 8 Darstellung der Genexpressionsanalyse von *Gfap* in CC und CX in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Fütterung mit Cuprizone.

4.3.3 S100 β

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von *S100 β* sind in Graph 9 dargestellt:



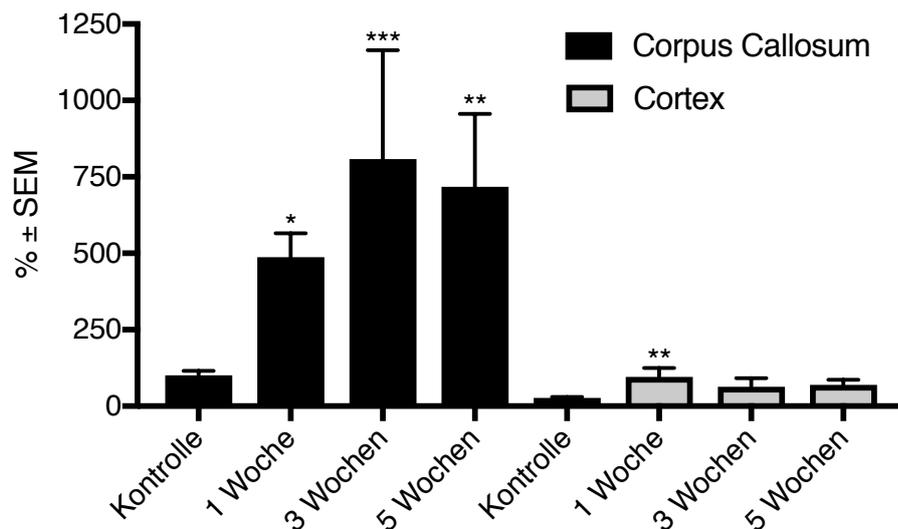
Graph 9 Darstellung der Genexpressionsanalyse von *S100 β* in CC und CX in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Fütterung mit Cuprizone.

Im Corpus Callosum sinkt die Genexpression von *S100 β* nach einer Woche Intoxikation mit Cuprizone auf $29 \pm 4\%$ und steigt dann nach drei Wochen bzw. fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone wieder langsam an ($40 \pm 8\%$ bzw. $49 \pm 5\%$). Dabei ist jedoch nur der Unterschied zwischen Kontrolltieren und einer Woche Intoxikation statistisch signifikant ($p < 0.0001$). Im Cortex ist das Genexpressionsniveau von *S100 β* bereits bei den Kontrolltieren geringer ($89 \pm 16\%$), sinkt dann nach einer Woche

Intoxikation mit Cuprizone auf $59\pm 4\%$ ab und steigt nach drei Wochen ($73\pm 11\%$) wieder an und hat nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone wieder ähnliche Werte wie in den Kontrolltieren erreicht ($87\pm 3\%$).

4.3.4 Vimentin

Die Ergebnisse der Untersuchung des Genexpressionslevels von Vimentin sind in Graph 10 dargestellt:

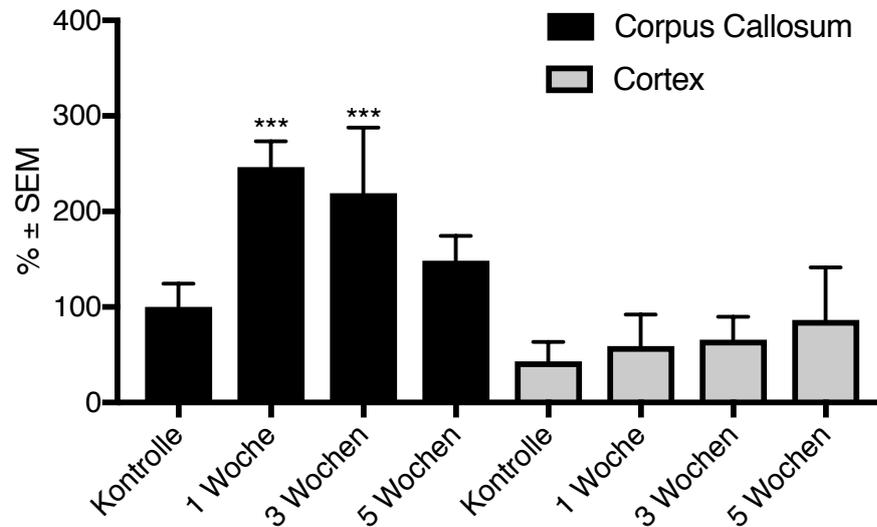


Graph 10 Darstellung der Genexpressionanalyse von Vimentin in Corpus Callosum und Cortex in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Fütterung mit Cuprizone.

Im Corpus Callosum steigt das Genexpressionslevel von Vimentin nach einer Woche Intoxikation mit Cuprizone stark an ($487\pm 35\%$). Nach drei Wochen Intoxikation mit Cuprizone steigt es weiter an ($808\pm 159\%$) und sinkt dann nach fünf Wochen wieder geringfügig ab ($717\pm 107\%$). Der Unterschied der Genexpressionsniveaus von Vimentin in den Kontrolltieren bzw. nach einer, drei und fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone ist statistisch signifikant. Im Cortex ist das Genexpressionsniveau von Vimentin bereits bei den Kontrolltieren geringer ($26\pm 1\%$). Im Verlauf der Intoxikation mit Cuprizone ist es nach einer Woche auf $95\pm 12\%$ gestiegen, fällt dann nach drei Wochen Intoxikation auf $63\pm 13\%$ ab und bleibt dann auch nach fünf Wochen auf diesem Niveau stabil ($69\pm 8\%$). Der Unterschied des Genexpressionslevels von Vimentin zwischen Kontrolltieren und nach einer Woche Intoxikation mit Cuprizone ist statistisch signifikant.

4.3.5 BLBP

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von *Blbp* sind in Graph 11 dargestellt:



Graph 11 Darstellung der Genexpressionsanalyse von BLBP in CC und CX in Kontrolltieren, sowie nach einer, drei und fünf Wochen Fütterung mit Cuprizone.

Blbp steigt im Corpus Callosum nach einer Woche Intoxikation mit Cuprizone auf $246 \pm 11\%$ an. Nach drei Wochen Intoxikation sinkt das Genexpressionslevel von *Blbp* auf $219 \pm 31\%$ und fällt nach fünf Wochen weiter auf $148 \pm 12\%$. Der Unterschied zwischen Kontrolle und einer Woche bzw. drei Wochen Intoxikation mit Cuprizone ist statistisch signifikant. Im Cortex finden sich auch hier bei den Kontrolltieren ein niedrigeres Expressionsniveau von *Blbp* ($43 \pm 18\%$). Durch die Intoxikation mit Cuprizone steigt es nach einer Woche gering an ($59 \pm 15\%$) und bleibt dann nach drei bzw. fünf Wochen auf diesem Niveau stabil ($66 \pm 36\%$ bzw. $86 \pm 18\%$). Die Unterschiede des Genexpressionsniveaus von *Blbp* zwischen Kontrolltieren und Intoxikation mit Cuprizone sind jedoch nicht statistisch signifikant.

5 Diskussion

5.1 Funktion von Astrozyten im Gesunden und bei ZNS Erkrankungen

Astrozyten können aufgrund morphologischer Merkmale in zwei Arten unterschieden werden: protoplasmatische und faserförmige Astrozyten. Die protoplasmatischen Astrozyten sind häufiger vorhanden und kommen vor allem in der grauen Substanz vor, die faserförmigen Astrozyten sind vor allem in der weißen Substanz des Gehirns.^[59] Die Hauptaufgabe beider Astrozytenarten ist die Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns, wofür sie eine Vielzahl an Rezeptoren, Kanälen und membrangebundenen Transportern exprimieren. Astrozyten sorgen für die Regulation des intrazerebralen pH-Wertes und von Ionen-Gleichgewichten, versorgen das Gehirn mit Nährstoffen, können den Blutfluss kontrollieren, Wachstumsfaktoren ausschütten sowie vor oxidativem Stress schützen und sind an der Aufnahme von Neurotransmittern wie Glutamat aus Synapsen beteiligt. Die Aufnahme von Glutamat in die Astrozyten erfolgt hauptsächlich durch die beiden Natriumgekoppelten Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2. EAAT2 wird sowohl in Astrozyten der grauen als auch der weißen Substanz exprimiert und ist für 90% des Glutamat-Uptakes im erwachsenen Gehirn verantwortlich. In der weißen Substanz ist die Expression von EAAT2 deutlich geringer und diese Zellen zeigen auch einen langsameren Glutamat-Uptake.^[60-62] Die Kontrolle der extrazellulären Glutamatkonzentration ist von großer Bedeutung, denn Glutamat ist in hohen Konzentrationen toxisch und führt zum Zelltod sowohl der Neuronen als auch der Oligodendrozyten. Eine übermäßige Aktivierung der Glutamatrezeptoren resultiert in einer Erhöhung des Energieverbrauchs der Zellen sowie der Produktion freier Radikale und der so veränderte Zellmetabolismus endet im Zelltod.^[34] Bei Erkrankungen des ZNS gehen die pathologischen Mechanismen mit Entzündungsreaktionen einher. Die molekularen, morphologischen und funktionellen Veränderungen der Astrozyten werden als „reaktive Astroglie“ bezeichnet. Reaktive Astrozyten verlieren einige ihrer entscheidenden Funktionen wie die astrogliale Glutamataufnahme, oder sie setzen übermäßig Transmitter frei, die für eine Glutamat-Exzitotoxizität prädisponieren.^[60] Es konnte gezeigt werden, dass die Exzitotoxizität von Glutamat auch bei der Pathogenese von MS eine Rolle spielt.^[63-64] Im Rahmen von *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass es in kultivierten Astrozyten durch T-Zell vermittelter Freisetzung von TNF- α zu einer signifikanten Reduktion der Expression

von EAAT1 kommt.^[65] Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression von *Eaat1-4* im Cuprizone-Modell untersucht. Die Expression des Transporters EAAT5 konnte nicht untersucht werden, da für diesen kein geeigneter Primer für die Detektion des Transporters im Cortex gefunden werden konnte. Der Transporter EAAT5 wird jedoch hauptsächlich in der Retina exprimiert,^[38] so dass die verwendete Zellmenge für die Detektion dieses Transporters zu gering gewesen sein könnte.

Das Cuprizone-Modell zur Untersuchung von MS basiert auf der Induktion von Demyelinisierung. Allerdings ist der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht abschließend geklärt. Es ist bekannt, dass Entzündungsmediatoren wie TNF- α oder auch Prostaglandine die Genexpression des Glutamattransporters EAAT1 reduzieren. In meinen Versuchen konnte ich aber keine statistisch signifikante Änderung der Genexpression von *Eaat1-4* feststellen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Genexpression von EAAT1-4 im Cuprizone-Modell stabil bleibt und das Modell für diese Fragestellung somit nicht geeignet ist. Um dies zu überprüfen könnte man die Versuche mit der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wiederholen, da es bei diesem Modell zur Aktivierung von antigen-spezifischen T-Zellen der sekundären lymphatischen Organe kommt. Diese führen zu einer Proliferation autoreaktiver T-Zellen, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden und so zu inflammatorischen Läsionen führen.^[66]

5.2 GFAP als astrozytenspezifischer Marker in immunhistochemischen Färbungen

Die gängige Literatur unterscheidet zwischen fünf Intermediärfilamenten: Neurofilamente, die in Neuronen vorkommen, Vimentin, das hauptsächlich in mesenchymalen Zellen vorkommt, Desmin, das vor allem in Muskelzellen gebildet wird, Keratinfilamente, die vor allem in epithelialen Zellen vorkommen und Gliafilamente, die hauptsächlich in Astrozyten gefunden werden.^[67]

Das glial fibrillary acidic protein (engl. für fibrilläres saures Protein der Glia, GFAP), das ursprünglich im Gehirn von MS Patienten entdeckt wurde,^[68] ist neben Vimentin,^[69] Nestin^[70] und Synemin^[71] Bestandteil des Zytoskeletts der Astrozyten.^[72] Die genaue Funktion von GFAP ist nicht abschließend geklärt, aber es ist mehr als nur mechanische Stabilisierung der Plasmamembran. In den letzten Jahren wurden mehrere Mausmodelle untersucht in denen entweder ein Mangel^[73-76] oder eine

Überexpression^[77] von GFAP experimentell herbeigeführt wurde. Dabei zeigte sich, dass GFAP in Astrozyten bei der Zellmigration, der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke, in Signaltransduktionswegen und auch Neuron-Glia-Wechselwirkungen beteiligt ist.^[78] Lange Zeit galt GFAP als ein spezifisches Intermediärfilament für Astrozyten und gilt als etablierter Marker für diese Zellart. Heute weiß man, dass GFAP in vielen Geweben und in einer Vielzahl von Zelltypen auch außerhalb des ZNS exprimiert wird, die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit Astrozyten aufweisen. GFAP konnte neben dem ZNS auch in peripheren und enterischen Gliazellen ^[79] aber auch Schwann-Zellen nachgewiesen werden.^[80] Außerhalb des Nervensystems konnte GFAP in Lebersternzellen,^[81-82] Chondrozyten,^[83] Fibroblasten,^[84] Myoepithelzellen ^[85] sowie Lymphozyten ^[86] nachgewiesen werden. Die Funktion dieser Zellen und ihre potentielle Ähnlichkeit zu Astrozyten ist nicht geklärt, aber sie scheinen die Funktionen der Astrozyten bei der Gewebereparatur und Narbenbildung und als Regulatoren lokaler Immun- und Entzündungsreaktionen zu teilen.^[60] Zusätzlich gibt es nicht nur eine Isoform von GFAP, denn GFAP kommt im Menschen vielmehr in verschiedenen Isoformen vor, die sich am C-Terminus des Proteins unterscheiden.^[87-88] Das Problem bei immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen GFAP ist, dass oft nicht bekannt ist, an welches Epitop des GFAP der Antikörper bindet.^[78] Das zeigt sich auch darin, dass Antikörper die an GFAP im ZNS binden, nicht zwingend dazu geeignet sind GFAP in anderen Geweben zu identifizieren.^[89] In immunhistochemischen Färbungen besteht somit bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern die nur an ein Epitop binden die Gefahr, dass lediglich ein Teil der Astrozyten angefärbt wird. Es gibt verschiedene Ansätze dieses Problem zu umgehen. Zum einen kann man eine Doppelfärbung mit zwei monoklonalen Antikörpern durchführen, die an unterschiedliche Epitope derselben Zielstruktur binden. Zusätzlich können diese Antikörper auch mit Fluorophoren unterschiedlicher Wellenlänge markiert sein um so das Bindungsverhalten der Antikörper untersuchen zu können. Zum anderen kann man, so wie es auch im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurde, polyklonale Antikörper verwenden d.h. eine Mischung verschiedener Antikörper, die aus dem Serum immunisierter Tiere gewonnen wurden. Eine andere immunhistochemische Methode, die im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde, ist die Fluoreszenz-Doppelfärbung. Dabei werden polyklonale Antikörper, die an zwei unterschiedliche Zielstrukturen binden, verwendet, die mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind. Im

Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode bei der Untersuchung von GFAP und ALDH1L1 angewendet. Die Fluoreszenz-Doppelfärbungen hat im Vergleich zur Einzelfärbung den Vorteil, dass in einem Experiment mehrere Antigene des Gewebes im selben Gewebeschnitt untersucht werden können und so Gewebe gespart werden kann. Dabei muss aber beachtet werden, dass ein direkter Vergleich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Antigene nicht möglich ist. Ein Grund ist, dass die verwendeten Antikörper unterschiedliche Affinitäten zu den Epitopen der untersuchten Strukturen aufweisen und somit unterschiedlich stark binden. Auch kann es während der Färbung zu einer Hemmung der Bindung der Antikörper kommen, wenn die Bindung des einen Antikörpers an das Epitop durch den anderen Antikörper z.B. durch sterische Effekte gehemmt wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass GFAP zwar durchaus dazu geeignet ist, Astrozyten nachzuweisen. Bei der Wahl des Antikörpers muss aber zwingend darauf geachtet werden, dass der Antikörper auch an die richtige Isoform des GFAP bindet. Zudem kann man die Validität der Messungen durch Verwendung von z.B. Fluoreszenz-Doppelfärbungen erhöhen.

5.3 Astrozytenaktivierung und reaktive Gliose

Der Ausdruck „reaktive Astroglie“, bzw. „reaktive Gliose“ beschreibt die Reaktion der Astrozyten auf Veränderungen im ZNS durch Trauma, Krankheiten wie Epilepsie oder Schlaganfall und neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Multiple Sklerose. Reaktive Gliose ist definiert als konstitutive, mehrstufig-gestaffelte und evolutionär konservierte defensive astrogliale Reaktion.^[90] Im Vergleich zu Astrozyten im gesunden ZNS ändern reaktive Astrozyten ihre Morphologie und Funktionen, was sich in der veränderten Expression vieler Gene widerspiegelt.^[48, 91-92] Reaktive Astrozyten zeigen eine Reihe von molekularen und morphologischen Merkmalen (siehe Kapitel 5.1). Die Aktivierung der Astrozyten erfolgt durch eine Reihe von Zytokinen, einschließlich des transformierenden Wachstumsfaktors TGF- α , des ciliären neurotrophen Faktors (CNTF), Interleukin 6 (IL-6), des Leukämie-Inhibierungsfaktors (ILF) oder durch Onkostatin M.^[93-98]

Um die Effekte der reaktiven Gliose bei der Multiplen Sklerose zu untersuchen bedient man sich unterschiedlicher Tiermodelle. Es gibt aktuell vier etablierte experimentelle Ansätze zu Induktion MS-typischer Demyelinisierungen, die die MS-Pathologie teilweise widerspiegeln: genetische Myelinmutationen, autoimmun-

entzündungsinduzierte Demyelinisierung (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, EAE), virusinduzierte Demyelinisierung und toxische Demyelinisierung (Cuprizone und Lysolecithin-Modelle).^[18, 99] Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Cuprizone-Modell verwendet. Cuprizone ist ein Kupfer-Chelator, der viele Metalloenzyme wie z.B. Ceruloplasmin beeinträchtigt, die Aktivität der kupferabhängigen Cytochromoxidase vermindert, die oxidative Phosphorylierung verringert und degenerative Veränderungen in Oligodendrozyten bewirkt und dadurch zur Demyelinisierung führt.^[100-101] Die Intoxikation mit Cuprizone führt zur Apoptose der Oligodendrozyten, was in einer Demyelinisierung in vielen Regionen der grauen und weißen Substanz, aber vor allem des Corpus Callosums und des Cortex resultiert.^[102] Der genaue zugrunde liegende Mechanismus des Cuprizone-induzierten Zelltodes der Oligodendrozyten ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass Cuprizone Veränderungen der Mitochondrienmorphologie induziert, so dass vermutet wird, dass die neurotoxischen Eigenschaften dieser Verbindung auf Störung der Zellatmung, einer der Schlüsselfunktionen der Mitochondrien, beruhen.^[9] Die histopathologischen Veränderungen, die durch Cuprizone hervorgerufen werden umfassen Apoptose der Oligodendrozyten, die bereits wenige Tage nach Beginn der Fütterung der Versuchstiere mit Cuprizone beginnt, gefolgt von Mikrogliaaktivierung, reaktiver Astroglie und schließlich Demyelinisierung, die sich jedoch erst nach ein paar Wochen Intoxikation mit Cuprizone nachweisen lässt.^[66, 103]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die degenerativen Veränderungen im Cortex und im Corpus Callosum untersucht, da Veränderungen in beiden Hirnregionen zu den zentralen neuroanatomischen Merkmalen des Cuprizone-Modells gelten. In beiden Hirnregionen ist der Beginn der reaktiven Astroglie nach 3 Wochen nachweisbar,^[103] weshalb wir im Rahmen dieser Arbeit Kontrolltiere mit Tieren nach einer, drei und fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone untersucht haben. Cuprizone bewirkt aber nicht nur eine reaktive Glie, sondern wirkt auch toxisch auf Oligodendrozyten und bewirkt eine Demyelinisierung. Dies muss man bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit mitberücksichtigen, da bei der verwendeten Genexpressionsanalyse nur zwischen Hirnregionen unterschieden werden kann, nicht aber nach Zellart.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Veränderungen der Genexpression von verschiedenen Astrozytenmarkern untersucht. Generell lässt sich sagen, dass im Rahmen der Genexpressionsanalyse im Bereich des Corpus Callosum deutlichere

Effekte zu beobachten waren, als im Cortex, unabhängig davon ob man *Gfap*, *Vimentin*, *Aldh111*, *Blbp*, oder *S100 β* betrachtet. Diese Beobachtung war zu erwarten, da Clarner *et al.* bereits 2012 zeigen konnte, dass im Cuprizone Modell die Aktivierung der Mikroglia und damit die Gliose in demyelinisierten Bereichen der weißen Substanz im Vergleich zur grauen Substanz höher ist. In diesem Zusammenhang scheint die Menge an Myelinbruchstücken eine entscheidende Rolle zu spielen.^[104]

5.3.1 Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von GFAP

Wie im Kapitel 5.2 beschrieben, spielt GFAP bei der Funktion der Astrozyten eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Veränderungen der Genexpression von GFAP durch reaktive Astroglie im Cuprizone-Modell untersucht. Dabei zeigte sich mit Hilfe der PCR, dass auf Ebene der Transkription die Genexpression von *Gfap* nach einer Woche Intoxikation zunächst stabil bleibt und nach drei Wochen Intoxikation sowohl im Cortex als auch im Corpus Callosum stark ansteigt. Nach 5 Wochen zeigt sich nur im Cortex noch eine leichte Steigerung der Genexpression von *Gfap*, wohingegen sie im Corpus Callosum nahezu konstant bleibt. Auch auf Ebene der Translation zeigte sich mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung die gleiche Beobachtung: Sowohl im Corpus Callosum als auch im Cortex konnte nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone eine Zunahme der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den Kontrolltieren und damit eine Zunahme der Genexpression von GFAP nachgewiesen werden.

Das Ergebnis der Genexpressionsanalyse deckt sich mit der Literatur, da bekannt ist, dass die Astroglie erst nach drei Wochen nachweisbar ist.^[103] Ein zentrales Merkmal der Astroglie ist die Astrozytenhypertrophie charakterisiert durch eine gesteigerte Synthese von GFAP.^[105] Erste Arbeiten darüber wurden bereits 1979 von Latov *et al.* veröffentlicht.^[106] Somit kann man davon ausgehen, dass die verwendete Methode valide ist.

5.3.2 Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von *Aldh111*

Aktuelle Studien zur Genexpression von Astrozyten haben sich mit der Charakterisierung der molekularen Identität von Astrozyten beschäftigt.^[107] ALDH1L1 wurde dabei als neuer astroglialer Marker identifiziert, der auch in der Lage ist kortikale Astrozyten selektiv *in vivo* zu markieren.^[108] Außerdem scheint ALDH1L1 geeigneter als GFAP zum Nachweis von Astrozyten zu sein, da bekannt ist, dass die mRNA von ALDH1L1 im gesamten Gehirn stärker exprimiert wird wohingegen die mRNA von

GFAP vorwiegend in der weißen Substanz nachweisbar ist.^[39] ALDH1L1 ist ein Folatenzym das die Umwandlung von 10-Formyltetrahydrofolat in Tetrahydrofolat katalysiert und eine wichtige Rolle bei vielen Reaktionen wie z.B. der De-novo-Nukleotidbiosynthese oder der Regeneration von Methionin spielt, was einen Einfluss auf die Zellteilung und das Zellwachstum hat.^[109] Spezifische Funktionen von ALDH1L1 im ZNS sind nicht literaturbekannt, es scheint aber einen potentiellen Zusammenhang zwischen Neuralrohrdefekten in der frühen embryonalen Entwicklung und einer veränderten Genexpression von ALDH1L1 zu geben.^[110] Zamanian *et al.* konnten 2012 mit einer GeneChip Analyse von isolierten gesunden und reaktiven Astrozyten zeigen, dass beide Astrozytenpopulationen hohe Expressionslevel von *Aldh1l1* enthielten. Ein Unterschied des Genexpressionslevels von *Aldh1l1* zwischen gesunden und reaktiven Astrozyten konnten sie jedoch nicht nachweisen.^[111]

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die Genexpression von *Aldh1l1* im Corpus Callosum auf Transkriptionsebene nach drei Wochen Intoxikation mit Cuprizone leicht ansteigt, dann aber wieder auf den Ausgangswert absinkt. Der Anstieg in der dritten Woche ist jedoch nicht statistisch signifikant. Im Cortex dagegen bleibt das Genexpressionslevel von *Aldh1l1* nahezu konstant. Die Ergebnisse decken sich somit mit den von Zamanian *et al.* publizierten Erkenntnissen.^[111] Immunhistochemisch und somit auf Translationsebene konnte im Corpus Callosum jedoch ein deutlicher Anstieg der Genexpression des ALDH1L1 von 100% auf 253% nachgewiesen werden. Im Cortex bleibt die Genexpression wie auch in der PCR Untersuchung nahezu konstant. Mögliche Gründe für den beobachteten Expressionsanstieg im Corpus Callosum sind zum einen, dass eine erhöhte Translation nicht zwingend eine erhöhte Transkription benötigt, da die durch die Transkription erhaltene mRNA mehrfach translatiert werden kann. Zum anderen wird ALDH1L1 auch von Oligodendrozyten exprimiert,^[112] so dass es sich bei diesem Ergebnis auch um ein falsch positives Ergebnis handeln könnte.

5.3.3 Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von Vimentin
Vimentin gehört wie auch GFAP zu den Intermediärfilamenten der Astrozyten.^[44-46] Man findet Vimentin jedoch vor allem in unreifen Astrozyten bzw. deren Vorläuferzellen und im Verlauf wird es zunehmend durch GFAP ersetzt.^[47] Galou *et al.* zeigten mit Hilfe von Vimentin-knockout Mäusen, dass Vimentin die Bildung von GFAP in reaktiven Astrozyten bei Astroglie stabilisieren und für die Bildung von GFAP in diesen Zellen erforderlich sein kann.^[113] In dieser Arbeit zeigt sich bereits nach einer

Woche Intoxikation mit Cuprizone ein Anstieg der Genexpression von *Vimentin* im Corpus Callosum, der dann im weiteren Verlauf jedoch wieder geringfügig abfällt. Im Cortex steigt die Genexpression von *Vimentin* ebenfalls statistisch signifikant nach einer Woche an und fällt nach drei bzw. fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone wieder ab. Diese Beobachtung passt zu der von *Galou et al.*^[113], da die erhöhte Genexpression von *Vimentin* bereits nach einer Woche nachweisbar ist, während die Expression von GFAP erst nach drei Wochen ansteigt.

5.3.4 Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von S100 β

Die S100 Proteine gehören zu einer Familie kleiner Proteine mit einer Größe von etwa 10 kDa, die durch zwei Calcium-Bindestellen mit Helix-Loop-Helix Motiv gekennzeichnet sind. Der Name der Proteine leitet sich davon ab, dass sie zu 100% in Ammoniumsulfat löslich sind.^[114] S100 β wird in Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert und wird daher als Marker für Gliazellen angesehen.^[115-116] Jedoch scheinen auch das Ependym, der Plexus choroideus und andere neuronale Populationen ebenfalls S100 β zu exprimieren.^[115] S100 β interagiert mit einer Reihe von intrazellulären Zielproteinen, wie z.B. dem Protein 43 (GAP-43), der regulatorischen Domäne der Proteinkinase C (PKC), dem antiapoptotischen Faktor Bcl-2 und dem Tumorsuppressorgen P53.^[42] Eine Expressionsinduktion von S100 β kann die intrazelluläre Energieversorgung durch Aktivierung der Glykolyse und der Glykogenolyse erhöhen.^[117-118] S100 β ist aber nicht nur an der Regulation intrazellulärer Prozesse beteiligt, sondern ist auch ein sekretorisches Protein und zeigt zytokinähnliche Aktivitäten, die Interaktionen zwischen Gliazellen sowie Gliazellen und Neuronen vermitteln.^[119] Niedrige Konzentrationen von S100 β wirken neuroprotektiv gegen apoptotische Stimuli, fördern das Wachstum von Neuriten und die Proliferation von Astrozyten.^[120] Bei höheren Konzentrationen dagegen kann es neurotoxisch wirken und zum Zelltod der Astrozyten führen.^[121] In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von *S100 β* im Corpus Callosum bereits nach einer Woche Intoxikation mit Cuprizone auf 29% absinkt und dann nach drei bzw. fünf Wochen wieder langsam ansteigt. Im Cortex ist ein ähnlicher Trend zu beobachten, wenn auch nicht so ausgeprägt wie im Corpus Callosum. Hierbei muss man bedenken, dass *S100 β* im ZNS nicht nur in Astrozyten exprimiert wird sondern unter anderem auch von reifen Oligodendrozyten.^[122] Der Abfall der Genexpression von *S100 β* nach bereits einer Woche würde auch zur Apoptose der Oligodendrozyten passen, da diese

bereits nach wenigen Tagen beginnt, wohingegen die Astrogliose erst nach drei Wochen zu beobachten ist. ^[103]

5.3.5 Auswirkungen der Astrozytenaktivierung auf die Genexpression von BLBP

Das brain lipide binding protein (engl. für Lipid-bindendes Protein des Gehirns, BLBP), auch als fatty acid binding protein 7 (engl. für Fettsäure-bindendes Protein 7, FABP7) bezeichnet, gehört zur Familie der Fettsäure-bindenden Proteine, die am intrazellulären Transport von Fettsäuren beteiligt sind. Als Fettsäuretransporter besteht die Hauptfunktion von BLBP darin, den intrazellulären Transport mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu erleichtern.^[123] FABPs befinden sich im Zytoplasma der Zellen und sind 14-15 kDa große Proteine. Es wurden zehn FABP-Gene identifiziert, die eine spezifische Gewebeverteilung aufweisen.^[124] BLBP wird häufig als Marker für radiale Gliazellen verwendet ^[50, 52, 125-126] und wird in Zellen der Astrozytenlinie exprimiert.^[127-128] Bereits 2011 konnte unsere Arbeitsgruppe unter Verwendung des Cuprizone-Modells und mit Hilfe einer Affymetrix GeneChip® Analyse zeigen, dass die BLBP-Expression durch aktivierte Astrozyten in frühen Krankheitsverläufen stark hochreguliert wird, im weiteren Verlauf jedoch wieder sinkt.^[129] Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Genexpressionslevel von *Blbp* im Corpus Callosum nach einer Woche Intoxikation mit Cuprizone stark ansteigt ($246 \pm 11\%$), im weiteren Verlauf aber wieder auf $219 \pm 31\%$ bzw. $148 \pm 12\%$ nach drei bzw. fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone abfällt. Auch im Cortex zeigt sich nach einer Woche Intoxikation ein Anstieg der Genexpression von *Blbp* ($59 \pm 15\%$). Im Gegensatz zum Corpus Callosum bleibt die Genexpression von *Blbp* im weiteren Verlauf auf diesem Niveau nach drei bzw. fünf Wochen Intoxikation stabil ($66 \pm 36\%$ bzw. $86 \pm 18\%$). Die Unterschiede des Genexpressionsniveaus von *Blbp* im Cortex zwischen Kontrolltieren und Intoxikation mit Cuprizone sind jedoch nicht statistisch signifikant. Somit konnten die Ergebnisse der Affymetrix GeneChip®-Analyse unserer Arbeitsgruppe mit einer anderen Methode bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist eine multifokale, chronische und immunvermittelte entzündlich-degenerative Erkrankung des ZNS. Zur Untersuchung dieser Erkrankung kann man verschiedene Tiermodelle verwenden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Veränderungen von Astrozyten unter funktionellen und topographischen Gesichtspunkten im Cuprizone-Modell analysiert, einem toxischen Tiermodell, bei dem in Versuchstieren durch Fütterung mit dem Kupfer-Chelator Cuprizone MS-ähnliche Läsionen hervorgerufen werden.

Hierfür wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion die Veränderungen der Genexpression der Glutamattransporter EAAT1-4 im gesamten Gehirn der Versuchstiere, sowie die Genexpression der Astrozytenmarker GFAP, ALDH1L1, BLBP, S100 β sowie Vimentin im Cortex und im Corpus Callosum in Kontrolltieren sowie nach einer, drei und fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone untersucht. Die Verteilung der Astrozytenmarker von GFAP und ALDH1L1 wurden zudem immunhistochemisch mit einer Fluoreszenzdoppelfärbung in Kontrolltieren sowie nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone untersucht.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass im Cuprizone-Modell keine Veränderung der Genexpression der Glutamattransporter *Eaat1-4* zu beobachten ist. Bei der Untersuchung von GFAP zeigte sich sowohl in den Ergebnissen der PCR als auch in der Fluoreszenzdoppelfärbung eine Zunahme von GFAP im Cortex sowie im Corpus Callosum im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei ALDH1L1 dagegen konnte lediglich immunhistochemisch ein deutlicher Anstieg von ALDH1L1 im Corpus Callosum nach fünf Wochen Intoxikation mit Cuprizone nachgewiesen werden.

Bei der PCR-Untersuchung von *Vimentin* zeigte sich, dass es in Cortex und Corpus Callosum im zeitlichen Verlauf zunächst eine Zunahme der Genexpression gab, die dann aber nach drei bzw. fünf Wochen wieder abnahm. Beim Protein *S100 β* dagegen zeigte sich ein fast gegenläufiger Verlauf. In Corpus Callosum und Cortex nahm die Genexpression dieses Proteins nach einer Woche Intoxikation mit Cuprizone zunächst ab und stieg dann im weiteren Verlauf wieder an. Bei der Untersuchung von *Blibp* zeigte sich im Corpus Callosum zunächst eine Zunahme der Genexpression nach einer Woche Intoxikation, die dann aber im weiteren Verlauf wieder abnahm. Im Cortex dagegen stieg die Genexpression zunächst an, blieb dann aber im weiteren Verlauf stabil.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit im Cuprizone-Modell keine Veränderung der Genexpression der Glutamattransporter *Eaat1-4* beobachtet werden konnte. Bei den untersuchten Astrozytenmarkern dagegen konnten Unterschiede der Expression dieser Marker sowohl unter topographischen Gesichtspunkten als auch im zeitlichen Verlauf nachgewiesen werden. Zum genaueren Verständnis dieser Veränderungen und der sich für den Krankheitsverlauf der MS eventuell ergebenden Konsequenzen sind aber noch weiterführende Studien und Untersuchungen notwendig.

7 Literaturverzeichnis

- [1] P. K. Stys, G. W. Zamponi, J. van Minnen, J. J. G. Geurts, *Nature Reviews Neuroscience* **2012**, *13*, 507.
- [2] B. M. K. and, J. H. Noseworthy, *Annual Review of Medicine* **2002**, *53*, 285-302.
- [3] J. H. Noseworthy, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, B. G. Weinshenker, *New England Journal of Medicine* **2000**, *343*, 938-952.
- [4] T. Islam, W. J. Gauderman, W. Cozen, T. M. Mack, *Neurology* **2007**, *69*, 381.
- [5] C. R. Gale, C. N. Martyn, *Progress in Neurobiology* **1995**, *47*, 425-448.
- [6] W. B. Grant, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2006**, *92*, 65-79.
- [7] S. Fernández-Menéndez, M. Fernández-Morán, I. Fernández-Vega, A. Pérez-Álvarez, J. Villafani-Echazú, *Journal of the Neurological Sciences* **2016**, *361*, 213-219.
- [8] W. Fierz, *Virology Journal* **2017**, *14*, 42.
- [9] M. Kipp, T. Clarner, J. Dang, S. Copray, C. Beyer, *Acta Neuropathologica* **2009**, *118*, 723-736.
- [10] M. Scheld, B. J. Rüter, R. Große-Veldmann, K. Ohl, K. Tenbrock, D. Drey Müller, P. Fallier-Becker, A. Zendedel, C. Beyer, T. Clarner, M. Kipp, *The Journal of Neuroscience* **2016**, *36*, 1410.
- [11] H. Lassmann, M. Bradl, *Acta neuropathologica* **2017**, *133*, 223-244.
- [12] F. A. Tansey, H. Zhang, W. Cammer, *Neurochemical Research* **1996**, *21*, 411-416.
- [13] M. Stangel, C. Trebst, *Current Neurology and Neuroscience Reports* **2006**, *6*, 229-235.
- [14] Ø. Torkildsen, L. A. Brunborg, K.-M. Myhr, L. Bø, *Acta Neurologica Scandinavica* **2008**, *117*, 72-76.
- [15] W. W. Carlton, *Toxicol Appl Pharmacol* **1966**, *8*, 512-521.
- [16] W. W. Carlton, *Life Sci* **1967**, *6*, 11-19.
- [17] J. Praet, C. Guglielmetti, Z. Berneman, A. Van der Linden, P. Ponsaerts, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **2014**, *47*, 485-505.
- [18] V. Gudi, S. Gingele, T. Skripuletz, M. Stangel, *Frontiers in cellular neuroscience* **2014**, *8*, 73-73.
- [19] M. F. Stidworthy, S. Genoud, U. Suter, N. Mantei, R. J. M. Franklin, *Brain Pathology* **2006**, *13*, 329-339.

- [20] K. Hoffmann, M. Lindner, I. Gröticke, M. Stangel, W. Löscher, *Experimental Neurology* **2008**, *210*, 308-321.
- [21] A. Norkute, A. Hieble, A. Braun, S. Johann, T. Clarner, W. Baumgartner, C. Beyer, M. Kipp, *Journal of Neuroscience Research* **2009**, *87*, 1343-1355.
- [22] A. Groebe, T. Clarner, W. Baumgartner, J. Dang, C. Beyer, M. Kipp, *The Cerebellum* **2009**, *8*, 163-174.
- [23] T. Skripuletz, J.-H. Bussmann, V. Gudi, P. N. Koutsoudaki, R. Pul, D. Moharreggh-Khiabani, M. Lindner, M. Stangel, *Brain Pathology* **2010**, *20*, 301-312.
- [24] F. Pott, S. Gingele, T. Clarner, J. Dang, W. Baumgartner, C. Beyer, M. Kipp, *Brain Research* **2009**, *1305*, 137-149.
- [25] V. Gudi, D. Moharreggh-Khiabani, T. Skripuletz, P. N. Koutsoudaki, A. Kotsiari, J. Skuljec, C. Trebst, M. Stangel, *Brain Research* **2009**, *1283*, 127-138.
- [26] M. Lindner, S. Heine, K. Haastert, N. Garde, J. Fokuhl, F. Linsmeier, C. Grothe, W. Baumgärtner, M. Stangel, *Neuropathology and Applied Neurobiology* **2008**, *34*, 105-114.
- [27] K. Suzuki, *Science* **1969**, *163*, 81.
- [28] C. L. Hoppel, B. Tandler, *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 2311-2318.
- [29] W. F. Blakemore, R. A. Eames, K. J. Smith, W. I. McDonald, *Journal of the Neurological Sciences* **1977**, *33*, 31-43.
- [30] S. Arnold, C. Beyer, *Journal of Neurochemistry* **2009**, *110*, 1-11.
- [31] M. M. Hiremath, Y. Saito, G. W. Knapp, J. P. Y. Ting, K. Suzuki, G. K. Matsushima, *Journal of Neuroimmunology* **1998**, *92*, 38-49.
- [32] M. Ouardouz, E. Coderre, G. W. Zamponi, S. Hameed, X. Yin, B. D. Trapp, P. K. Stys, *Annals of neurology* **2009**, *65*, 160-166.
- [33] D. Pitt, P. Werner, C. S. Raine, *Nature Medicine* **2000**, *6*, 67.
- [34] N. C. Danbolt, *Progress in Neurobiology* **2001**, *65*, 1-105.
- [35] K. Tanaka, K. Watase, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, K. Wada, *Science* **1997**, *276*, 1699.
- [36] Y. Dehnes, F. A. Chaudhry, K. Ullensvang, K. P. Lehre, J. Storm-Mathisen, N. C. Danbolt, *The Journal of Neuroscience* **1998**, *18*, 3606.

- [37] S. Holmseth, Y. Dehnes, Y. H. Huang, V. V. Follin-Arbelet, N. J. Grutle, M. N. Mylonakou, C. Plachez, Y. Zhou, D. N. Furness, D. E. Bergles, K. P. Lehre, N. C. Danbolt, *The Journal of Neuroscience* **2012**, *32*, 6000.
- [38] J. L. Arriza, S. Eliasof, M. P. Kavanaugh, S. G. Amara, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 4155-4160.
- [39] J. D. Cahoy, B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg, S. A. Krupenko, W. J. Thompson, B. A. Barres, *The Journal of Neuroscience* **2008**, *28*, 264.
- [40] Y. Yang, S. Vidensky, L. Jin, C. Jie, I. Lorenzini, M. Frankl, J. D. Rothstein, *Glia* **2011**, *59*, 200-207.
- [41] L. F. Eng, *Journal of Neuroimmunology* **1985**, *8*, 203-214.
- [42] R. Donato, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2001**, *33*, 637-668.
- [43] R. Donato, G. Sorci, F. Riuzzi, C. Arcuri, R. Bianchi, F. Brozzi, C. Tubaro, I. Giambanco, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2009**, *1793*, 1008-1022.
- [44] U. Lendahl, L. B. Zimmerman, R. D. G. McKay, *Cell* **1990**, *60*, 585-595.
- [45] J. Schnitzer, W. W. Franke, M. Schachner, *The Journal of Cell Biology* **1981**, *90*, 435.
- [46] A. Bignami, T. Raju, D. Dahl, *Developmental Biology* **1982**, *91*, 286-295.
- [47] P. Bovolenta, R. K. H. Liem, C. A. Mason, *Developmental Biology* **1984**, *102*, 248-259.
- [48] M. Eddleston, L. Mucke, *Neuroscience* **1993**, *54*, 15-36.
- [49] M. Bibel, J. Richter, K. Schrenk, K. L. Tucker, V. Staiger, M. Korte, M. Goetz, Y.-A. Barde, *Nature Neuroscience* **2004**, *7*, 1003.
- [50] D. Barry, K. McDermott, *Glia* **2005**, *50*, 187-197.
- [51] P. Patrikios, C. Stadelmann, A. Kutzelnigg, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen, W. Brück, C. Lucchinetti, H. Lassmann, *Brain* **2006**, *129*, 3165-3172.
- [52] M. Sibbe, E. Förster, O. Basak, V. Taylor, M. Frotscher, *The Journal of Neuroscience* **2009**, *29*, 8578.

- [53] M. Kipp, T. Clarner, S. Gingele, F. Pott, S. Amor, P. H. v. d. Valk, C. E. Beyer, *Physiological research* **2011**, *60*, 49-60.
- [54] J. A. Blake, J. T. Eppig, J. A. Kadin, J. E. Richardson, C. L. Smith, C. J. Bult, *Nucleic Acids Research* **2017**, *45*, D723-D729.
- [55] N. R. Coordinators, *Nucleic Acids Research* **2016**, *44*, D7-D19.
- [56] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *Journal of Molecular Biology* **1990**, *215*, 403-410.
- [57] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, *Methods* **2001**, *25*, 402-408.
- [58] R. Sidman, B. Kosares, B. Misra, S. Senft, <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/index.html>
- [59] V. Matyash, H. Kettenmann, *Brain Research Reviews* **2010**, *63*, 2-10.
- [60] M. V. Sofroniew, H. V. Vinters, *Acta neuropathologica* **2010**, *119*, 7-35.
- [61] B. Liu, A. G. Teschemacher, S. Kasparov, *Journal of Neuroscience Research* **2017**, *95*, 2126-2139.
- [62] S. Köhler, U. Winkler, J. Hirrlinger, *Neurochemical Research* **2019**.
- [63] D. Pitt, P. Werner, C. S. Raine, *Nature Medicine* **2000**, *6*, 67-70.
- [64] P. Werner, D. Pitt, C. S. Raine, *Annals of Neurology* **2001**, *50*, 169-180.
- [65] T. Korn, T. Magnus, S. Jung, *The FASEB Journal* **2005**, *19*, 1878-1880.
- [66] M. Kipp, S. Nyamoya, T. Hochstrasser, S. Amor, *Brain Pathology* **2017**, *27*, 123-137.
- [67] E. Lazarides, *Annual Review of Biochemistry* **1982**, *51*, 219-250.
- [68] L. F. Eng, J. J. Vanderhaeghen, A. Bignami, B. Gerstl, *Brain Research* **1971**, *28*, 351-354.
- [69] C. Eliasson, C. Sahlgren, C.-H. Berthold, J. Stakeberg, J. E. Celis, C. Betsholtz, J. E. Eriksson, M. Pekny, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 23996-24006.
- [70] R. Thomsen, J. Pallesen, T. F. Daugaard, A. D. Børglum, A. L. Nielsen, *Glia* **2013**, *61*, 1922-1937.
- [71] R. Jing, U. Wilhelmsson, W. Goodwill, L. Li, Y. Pan, M. Pekny, O. Skalli, *Journal of Cell Science* **2007**, *120*, 1267-1277.
- [72] M. Pekny, M. Pekna, *The Journal of Pathology* **2004**, *204*, 428-437.
- [73] H. Gomi, T. Yokoyama, K. Fujimoto, T. Ikeda, A. Katoh, T. Itoh, S. Itoharu, *Neuron* **1995**, *14*, 29-41.

- [74] M. Pekny, P. Levéen, M. Pekna, C. Eliasson, C. H. Berthold, B. Westermark, C. Betsholtz, *EMBO J* **1995**, *14*, 1590-1598.
- [75] W. Liedtke, W. Edelmann, P. L. Bieri, F.-C. Chiu, N. J. Cowan, R. Kucherlapati, C. S. Raine, *Neuron* **1996**, *17*, 607-615.
- [76] M. A. McCall, R. G. Gregg, R. R. Behringer, M. Brenner, C. L. Delaney, E. J. Galbreath, C. L. Zhang, R. A. Pearce, S. Y. Chiu, A. Messing, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 6361.
- [77] A. Messing, M. W. Head, K. Galles, E. J. Galbreath, J. E. Goldman, M. Brenner, *Am J Pathol* **1998**, *152*, 391-398.
- [78] J. Middeldorp, E. M. Hol, *Progress in Neurobiology* **2011**, *93*, 421-443.
- [79] H. Kato, T. Yamamoto, H. Yamamoto, R. Ohi, N. So, Y. Iwasaki, *Journal of Pediatric Surgery* **1990**, *25*, 514-519.
- [80] D. Bianchini, I. De Martini, A. Cadoni, A. Zicca, M. Tabaton, A. Schenone, S. Anfosso, A. S. A. Wattar, D. Zaccheo, G. L. Mancardi, *Brain Research* **1992**, *570*, 209-217.
- [81] L. Zhao, A. D. Burt, *Journal of Molecular Histology* **2007**, *38*, 53-64.
- [82] S. Carotti, S. Morini, S. G. Corradini, M. A. Burza, A. Molinaro, G. Carpino, M. Merli, A. De Santis, A. O. Muda, M. Rossi, A. F. Attili, E. Gaudio, *Liver Transplantation* **2008**, *14*, 806-814.
- [83] J. J. Kepes, L. J. Rubinstein, H. Chiang, *Am J Pathol* **1984**, *117*, 471-483.
- [84] J. A. Hainfellner, T. Voigtländer, T. Ströbel, P. R. Mazal, A. S. Maddalena, A. Aguzzi, H. Budka, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2001**, *60*, 449-461.
- [85] G. Viale, M. Gambacorta, G. Coggi, P. Dell'Orto, M. Milani, C. Doglioni, *Virchows Archiv A* **1991**, *418*, 339-348.
- [86] H. Riol, M. Tardy, B. Rolland, G. Lévesque, M. R. Ven Murthy, *Journal of Neuroscience Research* **1997**, *48*, 53-62.
- [87] E. M. Hol, R. F. Roelofs, E. Moraal, M. A. F. Sonnemans, J. A. Sluijs, E. A. Proper, P. N. E. de Graan, D. F. Fischer, F. W. van Leeuwen, *Molecular Psychiatry* **2003**, *8*, 786-796.
- [88] R. F. Roelofs, D. F. Fischer, S. H. Houtman, J. A. Sluijs, W. Van Haren, F. W. Van Leeuwen, E. M. Hol, *Glia* **2005**, *52*, 289-300.

- [89] D. L. Feinstein, G. A. Weinmaster, R. J. Milner, *Journal of Neuroscience Research* **1992**, *32*, 1-14.
- [90] A. Verkhratsky, A. Butt, *General Pathophysiology of Neuroglia, Glial Physiology and Pathophysiology*, Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, **2013**.
- [91] M. Pekny, M. Nilsson, *Glia* **2005**, *50*, 427-434.
- [92] M. Pekny, M. Pekna, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2016**, *1862*, 483-491.
- [93] V. Balasingam, T. Tejada-Berges, E. Wright, R. Bouckova, V. W. Yong, *The Journal of Neuroscience* **1994**, *14*, 846.
- [94] C. G. Winter, Y. Saotome, S. W. Levison, D. Hirsh, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 5865-5869.
- [95] M. A. Klein, J. C. Möller, L. L. Jones, H. Bluethmann, G. W. Kreutzberg, G. Raivich, *Glia* **1997**, *19*, 227-233.
- [96] A. G. Rabchevsky, J. M. Weinitz, M. Coulpier, C. Fages, M. Tinel, M.-P. Junier, *The Journal of Neuroscience* **1998**, *18*, 10541.
- [97] K. Sriram, S. A. Benkovic, M. A. Hebert, D. B. Miller, J. P. O'Callaghan, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 19936-19947.
- [98] S. Hostenbach, M. Cambron, M. D'haeseleer, R. Kooijman, J. De Keyser, *Neurosci Lett* **2014**, *565*, 39-41.
- [99] A. Denic, A. J. Johnson, A. J. Bieber, A. E. Warrington, M. Rodriguez, I. Pirko, *Pathophysiology* **2011**, *18*, 21-29.
- [100] W. Cammer, *Journal of the Neurological Sciences* **1999**, *168*, 116-120.
- [101] B. Kalman, K. Laitinen, S. Komoly, *Journal of Neuroimmunology* **2007**, *188*, 1-12.
- [102] T. Clarner, K. Janssen, L. Nellessen, M. Stangel, T. Skripuletz, B. Krauspe, F.-M. Hess, B. Denecke, C. Beutner, B. Linnartz-Gerlach, H. Neumann, L. Vallières, S. Amor, K. Ohl, K. Tenbrock, C. Beyer, M. Kipp, *The Journal of Immunology* **2015**, *194*, 3400.
- [103] J. M. Vega-Riquer, G. Mendez-Victoriano, R. A. Morales-Luckie, O. Gonzalez-Perez, *Curr Neuropharmacol* **2019**, *17*, 129-141.
- [104] T. Clarner, F. Diederichs, K. Berger, B. Denecke, L. Gan, P. van der Valk, C. Beyer, S. Amor, M. Kipp, *Glia* **2012**, *60*, 1468-1480.

- [105] L. F. Eng, R. S. Ghirnikar, Y. L. Lee, *Neurochemical Research* **2000**, *25*, 1439-1451.
- [106] N. Latov, G. Nilaver, E. A. Zimmerman, W. G. Johnson, A.-J. Silverman, R. Defendini, L. Cote, *Developmental Biology* **1979**, *72*, 381-384.
- [107] D. Lovatt, U. Sonnewald, H. S. Waagepetersen, A. Schousboe, W. He, J. H. C. Lin, X. Han, T. Takano, S. Wang, F. J. Sim, S. A. Goldman, M. Nedergaard, *J Neurosci* **2007**, *27*, 12255-12266.
- [108] J. D. Cahoy, B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg, S. A. Krupenko, W. J. Thompson, B. A. Barres, *J Neurosci* **2008**, *28*, 264-278.
- [109] S. A. Krupenko, *Chem Biol Interact* **2009**, *178*, 84-93.
- [110] T. E. Anthony, N. Heintz, *Journal of Comparative Neurology* **2007**, *500*, 368-383.
- [111] J. L. Zamanian, L. Xu, L. C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R. G. Giffard, B. A. Barres, *The Journal of Neuroscience* **2012**, *32*, 6391.
- [112] C. J. Garwood, L. E. Ratcliffe, J. E. Simpson, P. R. Heath, P. G. Ince, S. B. Wharton, *Neuropathology and Applied Neurobiology* **2017**, *43*, 281-298.
- [113] M. Galou, E. Colucci-Guyon, D. Ensergueix, J. L. Ridet, M. Gimenez y Ribotta, A. Privat, C. Babinet, P. Dupouey, *The Journal of cell biology* **1996**, *133*, 853-863.
- [114] B. W. Moore, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1965**, *19*, 739-744.
- [115] J. Steiner, H.-G. Bernstein, H. Bielau, A. Berndt, R. Brisch, C. Mawrin, G. Keilhoff, B. Bogerts, *BMC Neurosci* **2007**, *8*, 2-2.
- [116] J. Steiner, H. G. Bernstein, B. Bogerts, T. Gos, C. Richter-Landsberg, M. T. Wunderlich, G. Keilhoff, *Neuroscience* **2008**, *154*, 496-503.
- [117] D. B. Zimmer, L. J. Van Eldik, *Journal of Biological Chemistry* **1986**, *261*, 11424-11428.
- [118] A. Landar, G. Caddell, J. Chessher, D. B. Zimmer, *Cell Calcium* **1996**, *20*, 279-285.
- [119] J. Steiner, B. Bogerts, L. Schroeter Matthias, H.-G. Bernstein, in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol. 49, **2011**, p. 409.

- [120] L. J. Van Eldik, M. S. Wainwright, *Restorative Neurology and Neuroscience* **2003**, *21*, 97-108.
- [121] *Journal of Neurotrauma* **2006**, *23*, 1185-1200.
- [122] S. Hachem, A. Aguirre, V. Vives, A. Marks, V. Gallo, C. Legraverend, *Glia* **2005**, *51*, 81-97.
- [123] G. K. Balendiran, F. Schnutgen, G. Scapin, T. Borchers, N. Xhong, K. Lim, R. Godbout, F. Spener, J. C. Sacchettini, *Journal of Biological Chemistry* **2000**.
- [124] J. H. Veerkamp, A. W. Zimmerman, *Journal of Molecular Neuroscience* **2001**, *16*, 133-142.
- [125] M. Bibel, J. Richter, K. Schrenk, K. L. Tucker, V. Staiger, M. Korte, M. Goetz, Y.-A. Barde, *Nature Neuroscience* **2004**, *7*, 1003-1009.
- [126] S. G. Gregory, S. Schmidt, P. Seth, J. R. Oksenberg, J. Hart, A. Prokop, S. J. Caillier, M. Ban, A. Goris, L. F. Barcellos, R. Lincoln, J. L. McCauley, S. J. Sawcer, D. A. S. Compston, B. Dubois, S. L. Hauser, M. A. Garcia-Blanco, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, G. for the Multiple Sclerosis Genetics, *Nature Genetics* **2007**, *39*, 1083-1091.
- [127] P. Bannerman, A. Hahn, A. Soulika, V. Gallo, D. Pleasure, *Glia* **2007**, *55*, 57-64.
- [128] R. Mita, J. E. Coles, D. D. Glubrecht, R. Sung, X. Sun, R. Godbout, *Neoplasia* **2007**, *9*, 734-IN727.
- [129] M. Kipp, S. Gingele, F. Pott, T. Clarner, P. van der Valk, B. Denecke, L. Gan, V. Siffrin, F. Zipp, W. Dreher, W. Baumgartner, S. Pfeifenbring, R. Godbout, S. Amor, C. Beyer, *Brain, Behavior, and Immunity* **2011**, *25*, 1554-1568.