

Einfluss einer Interferon- β Therapie auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen: Förderung der Regeneration?

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Alexandra Kotsiari
geboren am 06.12.1978, in Hannover

2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Otto

Tag der Promotion: 25.06.2010

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
Zusammenfassung	VIII
Abstract	X
1 Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie und Klinik	1
1.1.2 Diagnosekriterien	4
1.1.3 Pathogenese	5
1.1.4 Das Heterogenitätskonzept zur Läsionsentstehung	7
1.2 Oligodendrozyten	7
1.2.1 Ursprung und Differenzierung der Oligodendrozyten	8
1.2.2 Myelinisierung der Axone	10
1.2.3 Oligodendrozytenpathologie	11
1.2.4 Remyelinisierung	12
1.3 Interferone	13
1.3.1 Interferon- β	14
1.3.2 Immunmodulatorische Effekte von Interferon- β	14
1.3.3 Interferon- β in der Therapie der Multiplen Sklerose	15
1.3.4 Nebenwirkungen der Interferone	16
1.4 Zielsetzung	17
2 Material	18
2.1 Patienten	18
2.2 Zelllinien	19
2.3 Verwendete Tiere	19
2.4 Allgemeine Chemikalien	19

2.5	Zellkulturmedien, Wachstumsfaktoren und Zusätze	20
2.6	Standardmedien, -lösungen und -puffer	20
2.7	Antikörper	22
2.7.1	Primäre Antikörper	22
2.7.2	Sekundäre Antikörper	22
2.8	Materialien und Geräte	23
2.8.1	Verbrauchsmaterialien	23
2.8.2	Geräte	24
3	Methoden	25
3.1	Zellkultur	25
3.1.1	Medien und Kultivierungsbedingungen	25
3.1.2	Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
3.1.3	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	26
3.1.4	Beschichtung von Zellkulturflaschen, Glasdeckgläschen und Well Platten mit Poly-L-Lysin	26
3.1.5	Produktion von Antikörpern aus Hybridoma-Zelllinien	27
3.1.5.1	A2B5 und GalC monoklonale Antikörper	27
3.1.6	Herstellung von B104 konditioniertem Medium	27
3.2	Primärzellkultur	28
3.2.1	Gewinnung der gemischten Gliazellkultur aus neugeborenen Ratten	28
3.2.2	Kultivierung der gemischten Gliazellkultur	28
3.2.3	Aufreinigung von Mikroglia	29
3.2.4	Aufreinigung von Oligodendrozytenvorläuferzellen	30
3.2.5	Aufreinigung von Astrozyten	30
3.3	Gewinnung von Serum aus humanem Blut	31

3.4	Toxizitätsassay	31
3.4.1	Inkubation der gemischten Gliazellen mit humanem Serum	31
3.4.2	Bestimmung der Toxizität bzw. Proliferation	32
3.4.3	Statistische Auswertung der Daten des Toxizitätsassays	33
3.5	Immunozytochemische Färbungen	33
3.5.1	A2B5 und GalC - Doppelfärbung	34
3.5.2	A2B5 und BrdU - Doppelfärbung	35
3.5.3	GFAP - Astrozyten	36
3.5.4	OX42 - Mikroglia	37
3.6	Proliferationsassay	38
3.6.1	Inkubation der gemischten Gliazellkulturen mit humanem Serum	38
3.6.2	Bestimmung der Proliferation	38
3.6.3	Statistische Auswertung der Proliferationsdaten	39
3.7	Differenzierungsassay	39
3.7.1	Ausplattieren der einzelnen Gliazelltypen und Inkubation mit humanem Serum	39
3.7.2	Bestimmung der Differenzierung	40
3.7.3	Statistische Auswertung der Differenzierungsdaten	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Untersuchung der Toxizität von humanem Serum auf Oligodendrozytenvorläuferzellen	41
4.1.1	Toxische Konzentration von humanem Serum	41
4.1.2	Vergleich von 10% und 15% humanem Serum auf die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen	42
4.2	Proliferationsassay	45
4.2.1	Einfluss von Seren unbehandelter Multiple Sklerose-Patienten auf die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen	45

4.2.2	Interferon- β Behandlung kann dem inhibierenden Effekt des Serums von Multiple Sklerose-Patienten entgegenwirken	47
4.2.3	Der Effekt einer Interferon- β Therapie auf die Oligodendrozyten-Proliferation ist nach 12 Monaten evident	48
4.3	Differenzierungsassay	49
4.3.1	Die Differenzierung der Oligodendrozyten wird nicht von Serum unbehandelter und Interferon- β behandelter Multiple Sklerose-Patienten beeinflusst	49
4.3.2	Die Interferon- β -Therapie zeigt keinen Effekt auf die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen	51
5	Diskussion	53
6	Literaturverzeichnis	61
	Lebenslauf	77
	Danksagung	80

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A2B5	Marker für Oligodendrozytenvorläuferzellen <i>in vitro</i>
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BrdU	5-Brom-2'-Deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CIS	Clinically Isolated Syndrome, klinisch isoliertes Syndrom
cm	Zentimeter
CNP	2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Score
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FBS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FLIP	Fas-Associated Death Domain-Like Interleukin-1 β -Converting Enzyme Inhibitory Protein
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GalC	Galaktosylceramidase, Marker für reife Oligodendrozyten
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein, saures Gliafaserprotein
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HS	humanes Serum

IAP	Inhibitor of Apoptosis
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gamma
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
ISRE	Interferon-Stimulated Response Element
ITS	Insulin, Transferrin, Selensäure
JAK	Januskinase
L	Liter
M	Molar
m	milli
min	Minute
μ	mikro
MAG	Myelinassoziertes Glykoprotein
MBP	Myelin-Basisches Protein
MGP	gemischte Gliazellkultur
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Metalloproteinase
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	nano
NAbs	neutralisierende Antikörper
NaCl	Natriumchlorid
N2B3	Differenzierungsmedium für Oligodendrozytenvorläuferzellen
NG2	NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglykan
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGF α R	Platelet-Derived Growth Factor Alpha Receptor
PLP	Proteolipid-Protein
P/S	Penicillin/ Streptomycin
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
STAT	Signal Transducers and Activators of Transkription
SVZ	Subventrikuläre Zone
Tab.	Tabelle
T3	3,3',5-Triiodo-L-Thyronin
T4	3,3',5,''-Tetraiodo-L-Thyronin
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die Behandlung mit Interferon- β (IFN- β) ist eine der verfügbaren immunmodulierenden Therapien für die schubförmig-remittierende Multiple Sklerose (MS), die den Krankenverlauf mildert und die Schubrate herabsetzt. Es wurde gezeigt, dass mehrere entzündliche Prozesse durch die Wirkung von IFN- β gehemmt werden. Neben den immunmodulatorischen Effekten wird vermutet, dass IFN- β die Bildung von neurotrophischen Faktoren, wie Nerve Growth Factor (NGF) und Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) induzieren kann, die potenziell das Überleben der neuronalen und Gliazellen unterstützen könnten. Zytokine wie das Interleukin-6 (IL-6) sind dafür bekannt, das Überleben der Oligodendrozyten zu fördern und sind während der IFN- β -Therapie im Serum von MS-Patienten erhöht. Der genaue Wirkmechanismus von IFN- β ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt und es ist nur wenig über die direkten und indirekten Effekte von IFN- β auf die Gliazellen im zentralen Nervensystem (ZNS) bekannt.

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss einer IFN- β -Therapie auf die Proliferation und Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen in gemischten Gliazellkulturen aus neugeborenen Ratten untersucht. Die gemischten Gliazellkulturen wurden für fünf Tage mit Medium inkubiert, das mit 10% Serum von gesunden Kontrollen, unbehandelten MS-Patienten und IFN- β behandelten MS-Patienten versetzt worden war.

Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen durch die Seren unbehandelter MS-Patienten signifikant inhibiert wurde, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Die Inkubation der Oligodendrozytenvorläuferzellen mit Seren von MS-Patienten, die ≥ 12 Monate mit IFN- β behandelt worden waren, führte zu einer erhöhten Proliferation im Vergleich zu Oligodendrozytenvorläuferzellen, die mit Seren von unbehandelten MS-Patienten inkubiert wurden.

In einem zweiten Versuch wurden die Seren eines weiteren MS-Patientenkollektivs untersucht. Den MS-Patienten wurde Serum vor, 6 und ≥ 12 Monaten nach Beginn der IFN- β -Behandlung abgenommen. Vergleichbar mit den Ergebnissen des ersten Versuchs führte das Serum nach einer IFN- β -Behandlung von ≥ 12 Monaten, im Vergleich zu einer Behandlung von 6 Monaten zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen. Es konnten keine Unterschiede in der Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen beobachtet werden.

Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse dieser Dissertation, dass das Serum von unbehandelten MS-Patienten die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen signifikant inhibiert. Des Weiteren führt die Inkubation der Oligodendrozytenvorläuferzellen mit Serum von IFN- β behandelten Patienten nach einer Therapiedauer von ≥ 12 Monaten zu einer fast vollständigen Umkehrung des inhibierenden Effekts.

Schlagnorte: Multiple Sklerose, Interferon- β , Oligodendrozyten

Abstract

Interferon- β (IFN- β) treatment is one of the available therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis (MS) delaying disease progression and reducing relapse rate. Inhibition of several inflammatory processes of the immune system has been shown by IFN- β . Beside immunomodulatory effects, IFN- β is also suggested to induce neurotrophic molecules, such as nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) that potentially could support neural and glial cell survival. Cytokines such as Interleukin-6 (IL-6) are known to promote oligodendrocyte survival and are upregulated during IFN- β treatment in sera of MS patients. However, the exact mode of action of IFN- β in MS is not completely understood and little is known about direct or indirect effects of IFN- β on glial cells in the central nervous system (CNS).

In this dissertation, we have examined the influence of an IFN- β therapy on the proliferation and differentiation of primary oligodendrocyte precursor cells (OPC) in mixed glial cultures. Mixed glial cultures were incubated for 5 days with medium supplemented with 10% of sera from healthy controls, untreated MS patients and IFN- β treated MS patients.

Proliferation of OPC was significantly inhibited by sera from untreated MS patients compared to healthy controls. Sera from MS patients treated ≥ 12 months with IFN- β increased OPC proliferation versus cells incubated with sera from untreated MS patients.

In a second set of experiments we compared sera from another cohort of MS patients, collected longitudinally before, 6 months and ≥ 12 months after initiation of IFN- β treatment. Comparable to our cross-sectional study we found a statistically significant increase of OPC proliferation induced by MS serum after ≥ 12 months of IFN- β treatment compared to 6 months treatment. No effect on OPC differentiation was observed.

In conclusion, the current study demonstrates that sera from MS patients inhibit proliferation of OPC. Furthermore, treatment with IFN- β reverses this effect almost completely after a treatment period of approximately one year.

Keywords: Multiple Sclerosis, Interferon- β , Oligodendrocytes

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Das neuropathologische Hauptmerkmal ist die Bildung von sklerotischen Plaques, die das Endstadium eines Prozesses darstellen, welcher Entzündung, De- und Remyelinisierung, Verlust von Oligodendrozyten, Astrozytose und axonale Degeneration umfasst. Die Ätiologie der MS ist weiterhin ungeklärt. Es wird ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition vermutet, welches den autoimmunologischen Prozess initiiert (Compston und Coles, 2008; Trapp und Nave, 2008).

1.1.1 Epidemiologie und Klinik

Das Risiko MS zu entwickeln ist erhöht, wenn ein Verwandter ersten Grades an dieser Erkrankung leidet. Die lebenslange Wahrscheinlichkeit an MS zu erkranken liegt in der normalen Population bei 0,1%. Die Geschwister eines MS-Patienten tragen ein Risiko von 3% und eineiige Zwillinge sogar eins von bis zu 25% diese Erkrankung zu bekommen (Sadovnick et al., 2000), wobei allgemein Frauen ein doppeltes Risiko im Gegensatz zu Männern haben (Noseworthy et al., 2000). Ohne spezifische Immuntherapie führt die MS oft nach einigen Jahren zu signifikanten Behinderungen und schränkt die Patienten in ihrer Lebensqualität erheblich ein.

Die MS hat unterschiedliche Verlaufsformen. Man unterscheidet einen schubförmig-remittierenden von einem chronisch-progredienten Verlauf. Als Schub definiert man nach Ausschluss physiologischer Schwankungen akute, ohne assoziierte Infekte oder Fieber auftretende neurologische Ausfälle bzw. Verschlechterungen, die mindestens 24 Stunden andauern. Eine entzündlich-entmarkende Schädigung des ZNS liegt dabei zugrunde. Damit ein neuer Schub von einem vorangegangenen Schub unterschieden werden kann, müssen vier Wochen zwischen den Symptomen liegen, ansonsten wird von ein und demselben Schub ausgegangen. Eine vollständige Remission ist definiert als die komplette Rückbildung der Symptome eines Schubs, wobei man von einer Teilremission spricht, wenn die Symptome nur unvollständig abgeklungen sind. Bei der schubförmig-remittierenden MS kommt es nach einem Schub zur vollständigen oder unvollständigen Remission. Der chronisch-progrediente

Verlauf einer MS zeichnet sich dagegen durch unterschiedlich rasch zunehmende Verschlechterungen der neurologischen Befunde ohne Remission aus. Aus einer primär schubförmigen Form kann sich eine chronisch-progrediente Form entwickeln, was bei 65% der initial schubförmig verlaufenden Erkrankungsformen bei einem Alter von ca. 40 Jahren der Fall ist (Confavreux und Vukusic, 2006).

Die Symptome der MS, die während eines Schubes auftreten, sind unspezifisch und können auch bei anderen Erkrankungen in Erscheinung treten (Poser et al., 1979). Als typische Symptome gelten jedoch Sehstörungen, Störungen der Augenbewegungen, Paresen, Parästhesien, Ataxie, Blasenfunktionsstörungen und Trigeminusneuralgie. Bei vielen Patienten tritt im Verlauf eine gesteigerte körperliche und psychische Ermüdbarkeit (Fatigue) auf. Nicht zu vernachlässigen sind kognitive und psychische Störungen (Sadovnick et al., 1996).

Häufig kommt es zur vollständigen Rückbildung dieser Symptome. Bleiben die Behinderungen jedoch nach dem Ablauf von 3 Monaten nach dem letzten Schub bestehen, besteht nur noch eine geringe Rückbildungstendenz. Nach 6 Monaten geht man in 95% der Fälle von einem permanenten Defizit aus (Gold und Riekman, 2004).

Als klinischer Bewertungsmaßstab für den Schweregrad der Behinderung während der MS hat sich die EDSS-Skala (Expanded Disability Status Scale) bewährt (Kurtzke, 1983). In den EDSS-Wert gehen ausschließlich die Ergebnisse von Anamnese und klinischer neurologischer Untersuchung ein. Die Skala beginnt bei 0,0 und endet bei 10,0 (s. Tab. 1). Der Arzt bezieht sich bei der Ermittlung der EDSS auf die Untersuchung der Funktionellen Systeme (FS) des Patienten:

- Pyramidenbahn, z. B. Lähmungen
- Kleinhirn, z. B. Ataxie, Tremor
- Hirnstamm, z. B. Sprach/ Schluckstörungen
- Sensorium, z. B. Verminderung des Berührungssinns
- Blasen- und Mastdarmfunktionen, z. B. Harn- bzw. Stuhlinkontinenz
- Sehfunktionen, z. B. eingeschränktes Gesichtsfeld-Skotom
- Zerebrale Funktionen, z. B. Wesensveränderung, Demenz

Grad	Beschreibung
0	Normale neurologische Untersuchung (Grad 0 in allen FS)
1	Keine Behinderung, minimale Abnormität in einem funktionellen System (d.h. Grad 1)
1.5	Keine Behinderung, minimale Abnormität in mehr als einem FS (mehr als einmal Grad 1)
2	Minimale Behinderung in einem FS (ein FS Grad 2, andere 0 oder 1)
2.5	Minimale Behinderung in zwei FS (zwei FS Grad 2, andere 0 oder 1)
3	Mässiggrade Behinderung in einem FS (ein FS Grad 3, andere 0 oder 1) oder leichte Behinderung in drei oder vier FS (3 oder 4 FS Grad 2, andere 0 oder 1), aber voll gehfähig.
3.5	Voll gehfähig, aber mit mässiger Behinderung in einem FS (Grad 3) und ein oder zwei FS Grad 2; oder zwei FS Grad 3; oder fünf FS Grad 2 (andere 0 oder 1)
4	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 m. Aktiv während ca. 12 Stunden pro Tag trotz relativ schwerer Behinderung (ein FS Grad 4, übrige 0 oder 1)
4.5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 m. Ganztägig arbeitsfähig. Gewisse Einschränkung der Aktivität, benötigt minimale Hilfe, relativ schwere Behinderung (ein FS Grad 4, übrige 0 oder 1)
5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 200 m. Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivität zu beeinträchtigen (z. B. ganztägig zu arbeiten ohne besondere Vorkehrungen). (Ein FS Grad 5, übrige 0 oder 1; oder Kombination niedrigerer Grade, die aber über die Stufe 4.0 geltenden Angaben hinausgehen).
5.5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 100 m. Behinderung schwer genug, um normale tägliche Aktivität zu verunmöglichen (FS Äquivalente wie Stufe 5.0)
6	Bedarf intermittierend, oder auf einer Seite konstant, der Unterstützung (Krücke, Stock, Schiene) um etwa 100 m ohne Rast zu gehen. (FS-Äquivalente: Kombinationen von mehr als zwei FS Grad 3 plus)
6.5	Benötigt konstant beidseits Hilfsmittel (Krücke, Stock, Schiene), um etwa 20 m ohne Rast zu gehen (FS-Äquivalente wie 6.0)
7	Unfähig, selbst mit Hilfe, mehr als 5 m zu gehen. Weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Bewegt den Rollstuhl selbst und transferiert ohne Hilfe (FS-Äquivalente Kombinationen von mehr als zwei FS Grad 4 plus, selten Pyramidenbahn Grad 5 allein)
7.5	Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu tun. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbst, aber vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen. Benötigt eventuell motorisierten Rollstuhl (FS-Äquivalente wie 7.0)
8	Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden; pflegt sich weitgehend selbständig. Meist guter Gebrauch der Arme (FS-Äquivalente Kombinationen meist von Grad 4 plus in mehreren Systemen)
8.5	Weitgehend ans Bett gebunden, auch während des Tages. Einiger nützlicher Gebrauch der Arme, einige Selbstpflege möglich (FS-Äquivalente wie 8.0)
9	Hilfloser Patient im Bett. Kann essen und kommunizieren (FS-Äquivalente sind Kombinationen, meist Grad 4 plus)
9.5	Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu essen, zu schlucken oder zu kommunizieren (FS-Äquivalente sind Kombinationen von fast lauter Grad 4 plus)
10	Tod infolge MS

FS = Funktionelle Systeme

Tab.1: EDSS-Skala nach Kurtzke (Kurtzke, 1983)

1.1.2 Diagnosekriterien

Die ersten Diagnosekriterien von Schumacker und Rose basierten vorwiegend auf anamnetischen und klinisch-neurologisch erhobenen Befunden (Rose et al., 1976; Schumacker et al., 1965). Die Poser-Kriterien von 1983 schlossen eine neue Untersuchungsmethode, die des Liquors ein und 2001 wurden schließlich die McDonald-Kriterien veröffentlicht, die durch zusätzliche bildgebende Verfahren der Magnetresonanztomographie (MRT) die Diagnose stützen sollten (McDonald et al., 2001; Poser et al., 1983).

Die McDonald-Kriterien von 2001, die 2005 revidiert wurden, präsentieren ein diagnostisches Schema, das dem behandelnden Neurologen zur besseren und sicheren Diagnose verhelfen soll (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005). Die MS ist in der frühen Phase oft nicht sicher zu diagnostizieren. Durch die Kriterien soll die frühe Diagnose der MS vereinfacht und die falsch-positive bzw. -negative Diagnose verhindert werden. Wenn alle McDonald-Kriterien erfüllt werden können und keine bessere Erklärung für die klinische Präsentation besteht, kann die Diagnose MS gestellt werden. Falls der Verdacht besteht, die Kriterien jedoch nicht erfüllt werden können, wird die Diagnose mögliche MS gestellt. Falls eine andere Diagnose während der Evaluation aufkommt, die die Befunde der klinischen Präsentation besser erklärt, lautet die Diagnose keine MS (s. Tab. 2).

Klinische Präsentation	Zusätzliche Daten, die für eine MS Diagnose benötigt werden
Zwei oder mehr Schübe; objektiver klinischer Beweis von zwei oder mehr Läsionen	Keine
Zwei oder mehr Schübe; objektiver klinischer Beweis von einer Läsion	Dissemination im Raum, nachgewiesen durch: - MRT <i>oder</i> - zwei oder mehr MRT detektierte Läsionen und positiver Liquorbefund - weiteren Schub abwarten in einer anderen Region
Ein Schub; objektiver klinischer Beweis von zwei oder mehr Läsionen	Dissemination in der Zeit, nachgewiesen durch: - MRT <i>oder</i> - zweiter klinischer Schub
Ein Schub; objektiver klinischer Beweis von einer Läsion (monosymptomatische Präsentation; klinisches isoliertes Syndroms)	Dissemination im Raum, nachgewiesen durch: - MRT <i>oder</i> - zwei oder mehr MRT detektierte Läsionen und positiver Liquorbefund - zweiter klinischer Schub Dissemination in der Zeit, nachgewiesen durch: - MRT <i>oder</i> - zweiter klinischer Schub
Schleichende neurologische Progression, auf MS hindeutend	kontinuierlicher Krankheitsverlauf für ein Jahr (retrospektiv und prospektiv bestimmt) <i>und</i> zwei der folgenden Kriterien: a. positiver Befund nach MRT des Gehirns (neun T2 Läsionen oder vier oder mehr Läsionen mit positivem VEP) b. positiver Befund nach MRT des Rückenmarks (zwei fokale Läsionen) c. positiver Liquorbefund

MS = Multiple Sklerose; MRT = Magnetresonanztomographie; VEP = Visuell Evoziertes Potential

Tab. 2: Kriterien für die Diagnose der Multiplen Sklerose nach der Revision von 2005 (Polman et al., 2005).

1.1.3 Pathogenese

Die MS ist ein komplexer pathogener Prozess. Autoreaktive T-Zellen und B-Zellen lösen eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen die myelinisierten Axone der weißen und grauen Substanz des ZNS aus. Der genaue Ursprung dieser Erkrankung bleibt jedoch ungeklärt. Ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischen Suszeptibilitätsfaktoren wird vermutet. Immer wieder wird diskutiert, ob MS eine Infektionskrankheit ist. Dabei werden Pathogene, wie Chlamydia Pneumoniae (Sriram et al., 1998), das Humane Herpesvirus 6 (Soldan et al., 1997) und das Epstein-Barr-Virus (Serafini et al., 2007) mit der MS in Verbindung gebracht. Weitere Umweltfaktoren, wie z.B. das Sonnenlicht, Vitamin-D-Defizienz, Ernährung, Geomagnetismus, Luftverschmutzung, Radioaktivität, Zigaretten und Toxine könnten ebenfalls eine Rolle im Ursprung der MS spielen (Hernan et al., 2005; Marrie, 2004; Mikaeloff et al., 2007).

Pathophysiologisches Hauptmerkmal der MS sind Läsionen der weißen und grauen Substanz des ZNS, sogenannte Entmarkungsherde (Plaques). In vielen dieser Läsionen sind neben der

Demyelinisierung auch axonale Schädigungen nachweisbar (Trapp et al., 1999). Man geht heute davon aus, dass die Läsionen durch Myelin-reaktive CD4⁺-Zellen entstehen, die in der Peripherie stimuliert werden und anschließend in das Gehirn und das Rückenmark migrieren. Früher wurde vermutet, dass diese CD4⁺-Zellen Interferon- γ sekretierende T-Helferzellen (Th)-1 seien. Nun ist für die Th17-Zellen eine zentrale Rolle in der Entstehung der Autoimmunität im Tiermodell nachgewiesen worden (Bettelli et al., 2008). Zusätzlich konnte eine erhöhte Anzahl dieser Zellen bei der MS festgestellt werden (Kebir et al., 2007). Das von Th17-Zellen produzierte Interleukin (IL)-17 vermittelt seine inflammatorischen und gewebeschädigenden Effekte über den IL-17-Rezeptor. IL-17 induziert in Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten u. a. die Produktion der Zytokine IL-1 β , Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF)- α und IL-6, welche ihrerseits sehr potente Entzündungsmediatoren sind. Darüber hinaus produzieren Th17-Zellen selbst inflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-21, IL-22 und TNF- α (Leipe et al., 2009). Die Interleukine-17 und 22 können die Blut-Hirn-Schranke stören, was zu einer effizienten Penetranz der Th17-Zellen in das Gehirn führt und somit auch zur Zerstörung von Neuronen (Kebir et al., 2007; Tzartos et al., 2008).

Die Antigen-Spezifität dieser Immunantwort bleibt immer noch ungelöst, nicht zuletzt weil viele autoreaktive Lymphozyten in gesunden Individuen detektiert werden können. Ursprünglich wurden die Myelinproteine als Kandidaten für die Entstehung des Krankheitsprozesses favorisiert, jedoch werden auch andere Faktoren mit dem Ursprung der MS in Verbindung gebracht. Es wird vermutet, dass eine Autoimmunantwort z.B. gegen α B-Crystalline die physiologische Suppression der Entzündungsreaktion unterbindet (Ousman et al., 2007) und dass Antikörper gegen Neurofascin einen axonalen Schaden bei der MS vermitteln könnten (Mathey et al., 2007).

Wenn T-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen akkumulieren, werden proinflammatorische Zytokine freigesetzt, die die Immunantwort durch die Rekrutierung naiver Mikroglia verstärken. Es wird ein Kontakt zwischen aktivierten Mikroglia und Komponenten der Oligodendrozyten-Myelin-Einheit gebildet und opsoniert, mittels Liganden für die Mikroglia-Fc und -Komplementrezeptoren. Ein letales Signal kann dann durch das zelloberflächengebundene TNF- α geliefert werden (Zajicek et al., 1992). Akute demyelinisierte Läsionen zeigen axonale Schädigungen mit Transektion (Ferguson et al., 1997; Trapp et al., 1998), die mit der T-Zell- und Mikroglia-Infiltration korrelieren (Kuhlmann et al., 2002).

1.1.4 Das Heterogenitätskonzept zur Läsionsentstehung

Der Pathomechanismus zur Entstehung der MS-Läsionen ist bisher weitestgehend ungeklärt. Man geht jedoch davon aus, dass sowohl eine autoimmun-vermittelte Demyelinisierung als auch eine primäre Oligodendrozytenschädigung die Entstehung einer MS-Läsion auslösen können und spricht in diesem Zusammenhang von einer „Interindividuellen Heterogenität der Läsionsentstehung“ (Lucchinetti et al., 2000). Dieses Konzept besagt, dass bei bestehender intraindividuelle Läsionshomogenität eine Heterogenität der Patienten nachweisbar ist. Hierbei werden vier MS-Subtypen aufgrund ihrer individuellen Ausprägung der entzündlichen Komponenten, der Oligodendrozytenschädigung und der Histopathologie unterschieden. Die Typen I und II weisen eine ausgeprägte entzündliche Komponente mit Infiltration der Läsionen mit T-Zellen und Monozyten/ Makrophagen auf. Im Subtypen II finden sich zusätzlich Komplementfaktoren und Immunglobuline. Bei den Typen III und IV treten typischerweise Störungen der Oligodendrozyten auf. So weist der Typ III Zeichen der Oligodendrozytenapoptose auf und einen bevorzugten Verlust des myelinassoziierten Glykoproteins (MAG). Entsprechend der Heterogenität der Typen im histopathologischen Bild geht man auch von unterschiedlichen pathogenen Mechanismen der Läsionsentstehung aus. Dementsprechend basieren die Typen I und II auf primär (autoimmun) entzündlich vermittelten Demyelinisierungen und die Typen III und IV auf primären Schädigungen der Oligodendrozyten. Wie es zum initialen Ereignis der Schubauslösung kommt, bleibt dabei unklar. Als Ursache für die Oligodendrozytenapoptose werden unterschiedliche Mechanismen, wie z.B.: Stickstoffmonoxid (NO), Sauerstoffradikale, bestimmte Zytokine wie TNF- α , mitochondriale Schädigungen, glutamerge Schädigung oder auch endogene humane Retroviren diskutiert (Merrill und Scolding, 1999).

1.2 Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind die myelinbildenden Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Nachdem sie die komplexen Stadien der Proliferation, Migration und Differenzierung abgeschlossen haben, beginnen sie die Axone des ZNS mit der lipidreichen Biomembran zu umhüllen. Die so genannte Myelinscheide dient der elektrischen Isolierung der Axone und Nervenfasern. Sie ermöglicht die saltatorische Erregungsleitung des Aktionspotentials.

1.2.1 Ursprung und Differenzierung der Oligodendrozyten

Im Rückenmark werden die meisten Oligodendrozyten in den ventralen Regionen des Neuralrohrs gebildet, die zuerst Vorläuferzellen der Motorneurone hervorbringen und nach der Neurogenese und Gliogenese zur Bildung von Oligodendrozytenvorläuferzellen umschalten (Lu et al., 2002; Sun et al., 1998; Takebayashi et al., 2002; Zhou und Anderson, 2002). Aus dieser Region migrieren die Oligodendrozytenvorläuferzellen in das gesamte Rückenmark und differenzieren schließlich zu myelinbildenden Zellen. Später entsteht eine zusätzliche Quelle von Oligodendrozytenvorläuferzellen aus dem dorsalen Rückenmark, die 10-15% der im Rückenmark vorhandenen Oligodendrozytenvorläuferzellen hervorbringt (Cai et al., 2005; Fogarty et al., 2005).

Im Gehirn entstehen die meisten Oligodendrozyten während der Embryogenese und im frühen postnatalen Leben in den periventrikulären Germinalzonen (Olivier et al., 2001; Pringle und Richardson, 1993; Timsit et al., 1995; Vallstedt et al., 2005; Warf et al., 1991). Oligodendrozyten aus dem Prosencephalon entstehen aus Vorläuferzellen, die ihren Ursprung im embryonalen ventralen Telencephalon haben (Spassky et al., 1998; Woodruff et al., 2001). Diese frühe Welle der Oligodendrozyten wird abgelöst von den Oligodendrozyten, welche später in der Entwicklung vom dorsalen Telencephalon gebildet werden (Kessaris et al., 2006). Die subventrikuläre Zone (SVZ) bildet sich bei Ratten um E14 und wird ab E19 die vorherrschende Germinalzone. Sie nimmt nach dem Höhepunkt der Oligodendrozytengnese an Umfang ab, bleibt aber im Bereich der Seitenventrikel als Subependymalzone bestehen und es findet sich dort auch noch bei Adulten eine mitotische Aktivität (Blakemore, 1972; Kaplan und Hinds, 1980; McCarthy und Leblond, 1988; Prineas und Connell, 1979). Adulte neuronale Stammzellen können Oligodendrozyten generieren (Doetsch et al., 1999; Doetsch et al., 1997; Gritti et al., 1996; Morshead et al., 1994; Pluchino et al., 2003; Weiss et al., 1996). Auch nach Entstehung demyelinisierter Läsionen im Korpus Kallosum ist die adulte SVZ in der Lage neue Vorläuferzellen hervorzubringen, woraus sich Oligodendrozyten bilden, die sich an der Remyelinisierung beteiligen (Nait-Oumesmar et al., 1999; Picard-Riera et al., 2002).

Oligodendrozytenvorläuferzellen müssen weite Strecken im gesamten ZNS zurücklegen, um an ihr Ziel zu gelangen, das sich weit weg von ihrem Ursprung befindet. Da sie im differenzierten Stadium nicht mehr fähig sind zu migrieren, beginnen sie sich erst an ihrem Ziel zu myelinbildenden Oligodendrozyten zu formen (Frost et al., 1996; Levison und Goldman, 1993; Small et al., 1987). Bei dieser Reise müssen die Oligodendrozyten die Stadien der

Proliferation, Migration, Differenzierung und Myelinisierung durchlaufen. An der Expression von unterschiedlichen Markern in ihren jeweiligen Entwicklungsstadien kann man die Reifung der Oligodendrozyten verfolgen (s. Abb. 1).

Zu Beginn ihrer Entwicklung exprimieren die Oligodendrozytenvorläuferzellen das Protein Nestin, das spezifisch in neuroepithelialen Stammzellen gebildet wird und diese Zellen von anderen bereits differenzierten Zellen im Neuralrohr unterscheidet (Lendahl et al., 1990). Nestin wird stark in proliferierenden Oligodendrozyten exprimiert, wird aber herunterreguliert, sobald die Zelle anfängt zu differenzieren (Gallo und Armstrong, 1995).

Unreife Vorläuferzellen weisen *in vitro* unter anderem A2B5-Antigene auf ihrer Zelloberfläche auf. Zusätzlich werden *in vitro* und *in vivo* die Marker Platelet-Derived Growth Factor Alpha Receptor (PDGF α R) und Chondroitin Sulfate Proteoglycan NG2 (NG2) in dieser Entwicklungsphase der Vorläuferzelle exprimiert. In diesem Stadium sind die Zellen fähig aktiv zu proliferieren und zu migrieren. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass sie unter anderem in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 und dem Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Gard und Pfeiffer, 1993; Hardy und Reynolds, 1993; Milner et al., 1997; Raff et al., 1988; Richardson et al., 1988) proliferieren. Am Bestimmungsort angelangt wandeln sie sich zu Prä-oligodendrozyten mit mehr Fortsätzen um. Sie sind noch zur Zellteilung fähig und weisen den Marker O4 auf (Sommer und Schachner, 1981). In diesem Stadium schränkt sich ihre Migrationsfähigkeit ein (Orentas und Miller, 1996) bzw. geht ganz verloren (Pfeiffer et al., 1993), sowie auch der Einfluss des PDGF auf deren Proliferation (Gao et al., 1998; Hart et al., 1989; Pringle und Richardson, 1993). Die Entwicklung des Prä-oligodendrozyten zum unreifen Oligodendrozyten ist durch das Auftreten des Markers GalC und den Verlust des A2B5-Antigens auf der Zelloberfläche gekennzeichnet. Schließlich beginnen die Oligodendrozyten Myelinproteine zu exprimieren. Das erste myelinspezifische Protein ist die 2', 3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (Reynolds und Wilkin, 1988; Richardson et al., 1980; Sprinkle, 1989; Vogel und Thompson, 1988) gefolgt von anderen Markern wie dem Myelin-Basischen Protein (MBP) (Butt et al., 1995). Das Auftreten der myelinspezifischen Proteine MBP, MAG und Proteolipid-Protein (PLP) während der Differenzierung tritt sequentiell sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf (Dubois-Dalcq et al., 1986; Hardy und Reynolds, 1993; Monge et al., 1986; Pfeiffer et al., 1993) und kennzeichnet das Stadium des reifen Oligodendrozyten. Die Expression des Markers Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG) zeigt die vollständige Reifung der Oligodendrozyten an (Solly et al., 1996).

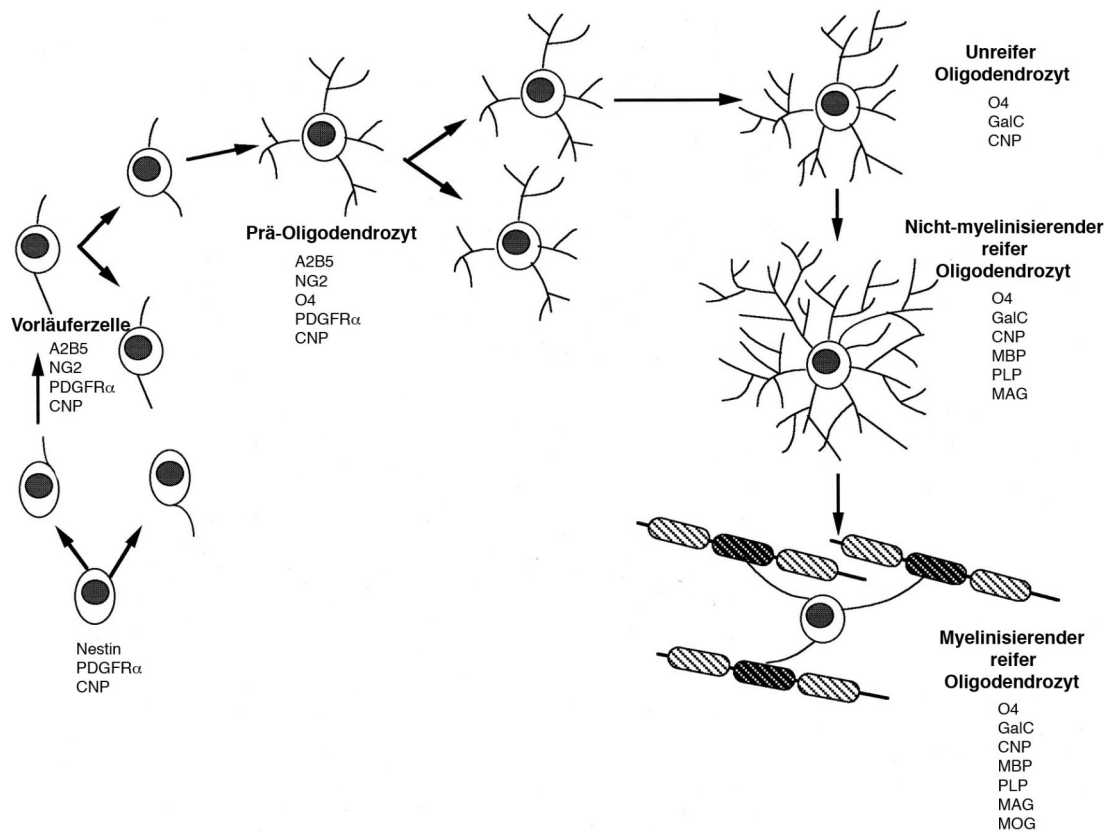


Abb.1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Entwicklungsstadien einer Oligodendrozyten-Vorläuferzelle bis zum myelinisierenden reifen Oligodendrozyt. Morphologische Veränderungen sowie die Expression der jeweiligen Antigene in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien werden gezeigt (Modifiziert nach Hardy und Reynolds, 1993).

1.2.2 Myelinisierung der Axone

Es steht nur ein kurzes Zeitfenster für den Beginn der Myelinisierung zur Verfügung. Die Oligodendrozyten haben 12-18 h Zeit um mehrere Axone, Schicht für Schicht mit Myelin zu ummanteln (Barres, 2008). Dafür müssen sie eine enorme Menge an Proteinen synthetisieren, sortieren und transportieren. Die Bildung und Anordnung von Myelin im ZNS ist ein komplexer Vorgang und erfordert viele verschiedene Signale, die die präzise Wechselwirkung zwischen Axonen und Oligodendrozyten steuern.

Die Oligodendrozyten myelinisieren nicht nur das Axon, sondern ermöglichen die Bildung von Natriumkanälen, an den Ranvierschen Schnürringen, was eine wichtige Voraussetzung für die saltatorische Erregungsleitung darstellt (Kaplan et al., 2001; Kaplan et al., 1997).

Auch die normalen axonalen Transportprozesse und das Überleben der Neurone hängen von der angemessenen Myelinisierung ab. Axone mit modifizierten Myelinschichten weisen Veränderungen in der Transportrate, in der Anzahl an Mikrotubuli und der Stabilität auf (Edgar et al., 2004; Kirkpatrick et al., 2001). Weitere Merkmale sind das Anschwellen des Axons und Anzeichen von Degeneration (Dupree et al., 1999; Garbern et al., 2002; Griffiths et al., 1998; Kassmann et al., 2007; Kassmann und Nave, 2008; Lappe-Siefke et al., 2003; Uschkureit et al., 2000).

Das Vorhandensein einer intakten Myelinschicht kann zu einem Anstieg des axonalen Durchmessers führen, was durch eine Akkumulation und Phosphorylierung der Neurofilamente vermittelt werden kann. Ein weiterer Vorteil ist die Auslieferung von trophischen Faktoren an die Neurone durch die Oligodendrozyten, wie z.B. durch die Produktion von Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Wilkins et al., 2003), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Dougherty et al., 2000) und Insulin-Like Growth Factor (IGF)-1 (Du und Dreyfus, 2002).

1.2.3 Oligodendrozytenpathologie

Aufgrund ihrer hohen metabolischen Rate mit ihren toxischen Nebenprodukten, dem hohen intrazellulären Eisen und die niedrige Konzentration an antioxidativem Glutathion sind Oligodendrozyten sehr anfällig für oxidativen Schaden (Juurlink, 1997; Thorburne und Juurlink, 1996).

Der Verlust von Oligodendrozyten kann durch inflammatorische Zytokine erfolgen. Das proinflammatorische Zytokin TNF- α kann durch die Bindung an den p55 TNF Rezeptor Apoptose der Oligodendrozyten induzieren (Jurewicz et al., 2005). Interferon- γ (IFN- γ) wirkt durch einen komplexen Mechanismus toxisch auf aktiv proliferierende Oligodendrozyten, jedoch nicht auf reife Oligodendrozyten (Horiuchi et al., 2006). Neben den direkten Effekten dieser Zytokine auf die Oligodendrozyten können auch indirekte Effekte durch inflammatorische Mediatoren ausgelöst werden. Sie stimulieren die Produktion von Radikalen in Mikroglia und Astrozyten. Sauerstoff- und Stickstoffmonoxid-Radikale können durch die Interaktion und Blockade mehrerer Proteine der Atmungskette die Mitochondrien der Oligodendrozyten schädigen (Li und Stys, 2000; Smith und Lassmann, 2002).

Oligodendrozyten können auch durch spezifische, zellselektive Mechanismen zerstört werden. Autoantikörper, die gegen das Epitop der extrazellulären Oberfläche von Myelin oder

Oligodendrozyten gerichtet sind, induzieren Demyelinisierung durch Komplementaktivierung oder mittels ihrer Erkennung durch den Fc-Rezeptor aktivierter Makrophagen. Bei der Aktivierung des Komplementsystems kommt es zur Bildung von C5b-9 Komplexen, die zur Lyse der Zielzelle führen (Niculescu et al., 2004; Rus et al., 2005).

Oligodendrozyten exprimieren ein Arsenal an Molekülen, die eine erhöhte Vulnerabilität der Oligodendrozyten durch Exzitotoxizität hervorrufen (Domercq et al., 2007; Li und Stys, 2000; Matute et al., 1997; McDonald et al., 1998; Sanchez-Gomez und Matute, 1999). Die Expression von AMPA-, Kainate- und NMDA-Rezeptoren macht die Oligodendrozyten anfälliger gegenüber der Toxizität durch Glutamat. Glutamat stellt eine potentiell toxische Substanz dar, die in einer erhöhten Konzentration im Extrazellulärraum des Gehirns zum Neuronenuntergang sowie zu Schwellungen von Nerven- und Gliazellen führen kann (Schneider et al., 1992).

1.2.4 Remyelinisierung

In der MS werden nicht alle demyelinisierten MS Läsionen remyelinisiert. Das Ausmaß der Remyelinisierung unterscheidet sich bei den einzelnen Patienten und hängt von der Lokalisation des Plaques im Gehirn und im Rückenmark ab. Eine umfangreiche Remyelinisierung findet bevorzugt in Läsionen des Vorderhirns in der subkortikalen und tiefen weißen Substanz statt. In den periventrikulären Regionen, dem Hirnstamm und Rückenmark findet eine Remyelinisierung eher seltener statt. Das zeigt, dass die Kapazität der Oligodendrozyten, sich zu remyelinisierenden Zellen zu differenzieren, von der Region im Gehirn und Rückenmark abhängt, was auf die intrinsischen Unterschiede in den verschiedenen Oligodendrozytenpopulationen zurückzuführen wäre (Bradl und Lassmann, 2009). Das Rekrutieren von Oligodendrozyten und die Remyelinisierung finden dabei in sehr frühen Stadien der Demyelinisierung statt. Während dieser frühen Phase sind die Läsionen noch mit Makrophagen und Lymphozyten infiltriert (Lassmann, 1983; Prineas et al., 1989; Raine et al., 1981). In diesen frischen Läsionen kann die Remyelinisierung durch die Entzündung, die infiltrierenden Makrophagen und die von ihnen angebotenen Wachstumsfaktoren erleichtert werden (Diemel et al., 1998; Kotter et al., 2001).

Der Ablauf der Remyelinisierung verläuft in mehreren Schritten. Zuerst müssen die adulten Oligodendrozyten rekrutiert werden, die von dem ruhenden Stadium in einen regenerativen Phänotyp umschalten müssen (Franklin und Ffrench-Constant, 2008). Dieser Wechsel wird

womöglich durch Faktoren bewirkt, die von den aktivierten Mikroglia und Astrozyten freigegeben werden (Glezer et al., 2006; Rhodes et al., 2006). Die Oligodendrozyten beginnen zu proliferieren und migrieren zur demyelinisierten Läsion. Danach setzt die Differenzierung und Myelinisierung der nackten Axone ein.

Obwohl der Prozess der Remyelinisierung und der Myelinisierung sich ähneln, gibt es einige Unterschiede. Die adulten Oligodendrozytenvorläuferzellen haben einen längeren Zellzyklus und haben eine langsamere Migrationsrate (Wolswijk, 2000). Notch, der Regulator für die Differenzierung der Oligodendrozyten in der Entwicklung ist unwichtig für die Remyelinisierung (Stidworthy et al., 2004). Es werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren bei den beiden Prozessen benötigt, was z.B. bei dem Oligodendrocyte Lineage-Specific Transcription Factor 2 (Olig2) der Fall ist (Arnett et al., 2004). Der letzte Unterschied stellt auch das pathologische Hauptmerkmal der Remyelinisierung dar und ist das Vorhandensein von Axonen mit ungewöhnlich dünnem Myelin und kürzeren internodalen Abständen in den demyelinisierten Läsionen (Blakemore, 1973; Suzuki et al., 1969).

1.3 Interferone

Die Interferone werden in mehrere Klassen eingeteilt. Zu den Klasse-I-Interferonen gehören das IFN- α und IFN- β , während das IFN- γ das einzige Klasse-II-Interferon darstellt. Interferone der Klasse I lösen ein weites Spektrum an biologischer Aktivität aus:

- antivirale und antiproliferative Stimulation zytotoxischer Aktivität mehrerer Arten von Immunzellen (T-Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) (Ortaldo et al., 1983);
- Erhöhung der Expression von Tumor-assoziierten Oberflächenantigenen und anderen Oberflächenmolekülen, wie Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I Antigen (Greiner et al., 1987);
- Induktion und/ oder Aktivierung von pro-apoptotischen Genen und Proteinen, z.B. B-Cell Lymphoma-2 (Bcl-2) und Inhibitor of apoptosis Protein (IAP);
- Modulation der Differenzierung;
- Anti-Angiogene Aktivität.

All diese Wirkungen machen die Interferone zu viel versprechenden Medikamenten für die Therapie mehrerer Krankheiten.

Die Wirkung der meisten Zytokine sowie auch Wachstumsfaktoren wird über eine Interaktion mit spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren und JAK-STAT Signal-Transduktion und andere Signalkaskaden übermittelt (Darnell et al., 1994; Pestka et al., 1987; Sen und Lengyel, 1992; Stark et al., 1998).

Die Klasse-I-Interferone teilen den gleichen Rezeptor-Komplex (Krause et al., 2006). Dieser besitzt zwei Ketten, die IFN- α R1 (IFNAR1) und die IFN- α R2 (IFNAR2), welche die bedeutendste Liganden-bindende Kette darstellt. Alle Klasse-I-Interferone aktivieren die Signal Transducers and Activators of Transkription (STAT) 1 und STAT2, Tyrosinkinase 2 (TYK2) und Januskinase 1 (JAK1) und induzieren Gene, die das Interferon-Stimulated Response Element (ISRE) im Promotor besitzen (Darnell et al., 1994; Fu et al., 1992).

1.3.1 Interferon- β

Das humane IFN- β -1b wird von gentechnisch veränderten Bakterien des Stammes *E. Coli* produziert. Da Bakterien nicht in der Lage sind Proteine zu glykosylieren, fehlt dem rekombinanten IFN- β -1b die Glykosylierung. Zusätzlich unterscheidet sich das rekombinante IFN- β -1b von dem natürlich vorkommenden in zwei Aminosäuren. Der Cystein-Rest an Position 17 wurde durch einen Serin-Rest ersetzt, um das Molekül zu stabilisieren und der N-terminale Methionin-Rest wurde entfernt (Mark et al., 1984).

1.3.2 Immunmodulatorische Effekte von Interferon- β

IFN- β beeinflusst das Gleichgewicht der pro-inflammatorischen (Th1) und anti-inflammatorischen (Th2) Zytokine. Mehrere Studien haben einen erhöhten Spiegel des Th2-Zytokins IL-10 im Serum und Liquor von MS-Patienten, die mit IFN- β behandelt worden waren, beobachtet (Lunemann et al., 2001; Rudick et al., 1998). Im Gegensatz dazu wird vermutet, dass die Produktion von Th1-Zytokinen (Yong et al., 1998), wie IL-12 und TNF- α inhibiert wird (Furlan et al., 2000).

Des Weiteren wird auch die Synthese des Th1-Zytokins IFN- γ durch das IFN- β vermindert, wodurch die Expression von Klasse-II-MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen verhindert wird.

Bei MS-Patienten zeigen die T-Lymphozyten eine stark erhöhte Expression der anti-apoptotischen Faktoren Inhibitor of Apoptosis (IAP) 1 und 2 und X-Linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) (Sharief und Semra, 2001). Diese Erhöhung der Expression korreliert mit der Resistenz der T-Zellen gegenüber der Apoptose. Ein weiteres wichtiges anti-apoptotisches Protein ist das Fas-Associated Death Domain-Like Interleukin-1 β -Converting Enzyme Inhibitory Protein (FLIP). Es konnte gezeigt werden, dass eine IFN- β -Behandlung der MS-Patienten die Expression von FLIP herunterreguliert, was zur Folge hat, dass die Resistenz der T-Zellen gegenüber der Apoptose herabgesetzt wird (Sharief et al., 2001).

Bei Patienten mit MS zeigt sich ein Einfluss der Metalloproteinasen (MMP) auf die Pathogenese der entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankung des ZNS. Die MMP-9 z.B. vereinfacht die Migration der Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke sowie die TNF- α Produktion (Cuzner und Opdenakker, 1999; Opdenakker et al., 2001). IFN- β kann die IL-2 induzierte Sekretion der Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 beeinflussen. Dieses kann zu einer dosisabhängigen, verminderten Migration von PBMCs oder auch T-Zellen in das Zentralnervensystem führen (Leppert et al., 1996; Stuve et al., 1996). Die Migration aus dem peripheren System in das ZNS wird zusätzlich durch das Herabsetzen der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie das Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1 (Calabresi et al., 1997a) und Chemokinen erschwert (Zang et al., 2001).

1.3.3 Interferon- β in der Therapie der Multiplen Sklerose

IFN- β -1b (als Betaferon[®] in Europa und Betaseron[®] in den USA) wurde vor etwa 15 Jahren als erste immunmodulatorische Therapie für die Behandlung schubförmiger MS zugelassen. Die Ausführung einer Phase III Studie führte zum größten therapeutischen Durchbruch. Die Gabe von 250 μ g IFN- β -1b jeden zweiten Tag durch subkutane Injektion zeigte einen schnellen Abfall der Schubfrequenz und des Schweregrades einer MS-Attacke. Zusätzlich konnte die kernspintomographisch gemessene Krankheitsaktivität signifikant gesenkt werden. Die Vorteile, die in der Pivot-Studie aufgezeigt wurden, konnten durch die Langzeitstudie bestätigt werden.

1.3.4 Nebenwirkungen der Interferone

Eine bekannte ungünstige Reaktion auf die Interferone ist die Lymphopenie und die gelegentlich auftretende Reaktion an der Einstichstelle nach der Verabreichung. Die Lymphopenie scheint einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Produktion, Rezirkulation und/ oder der Proliferation der Lymphozyten zu haben. Die Symptome der Lymphopenie gehen zurück, sobald die Interferon-Behandlung beendet wird. Obwohl die Mechanismen der Lymphopenie bekannt sind, bleiben die von anderen Nebenwirkungen als Folge einer Interferon-Therapie ungeklärt (Pestka, 2007).

Grippe-ähnliche Symptome, wie Kopfschmerzen, Unwohlsein, Fieber, Schüttelfrost, Müdigkeit, Myalgie, Rücken- und Gelenkschmerzen treten auch als Nebenwirkung auf. Obwohl diese Symptome schon einige Stunden nach der Verabreichung verschwinden, limitieren diese Nebenwirkungen signifikant die Dosis der Interferone, die systemisch verabreicht werden kann (Pestka, 2007).

Während einer Interferon-Therapie entwickelt ein signifikanter Prozentsatz der Patienten neutralisierende Antikörper gegen IFN- β (NAbs). Die Ergebnisse einer umfangreichen Studie zeigten, dass die Auswirkung der NAbs zu einer geringeren Wirksamkeit von IFN- β -1b in NAb positiven (NAb+) Patienten führt. Jedoch ist der Krankheitsverlauf in NAb+ Patienten weniger gekennzeichnet, als in NAb negativen Patienten (NAb-) (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996). Ähnliche Ergebnisse ergaben mehrere Kurzzeitversuche, die demonstrierten, dass Patienten, die NAbs gegen IFN- β -1b und -1a entwickelt hatten, eine erhöhte Schubrate und Läsionsaktivität im MRT aufzeigten. Die NAbs hatten jedoch keine relevante Auswirkung auf den Verlauf der Behinderung (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996; Kappos et al., 2005; Polman et al., 2003).

1.4 Zielsetzung

In dieser Dissertation sollen die Effekte von IFN- β auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen charakterisiert werden. Insbesondere soll der Frage nachgegangen werden, ob ähnliche Effekte, wie sie durch die Zugabe von rekombinantem IFN- β beobachtet wurden, auch durch die Behandlung von MS-Patienten mit Betaferon erreicht werden können. Hierfür sollen Seren von Betaferon behandelten Patienten und Kontrollpersonen gemischten Gliazellkulturen zugegeben werden und die Oligodendrozytenvorläuferzellen auf Proliferation und Differenzierung untersucht werden. Da bereits beschrieben wurde, dass Seren von MS-Patienten die Proliferation von Gliazellen inhibieren können, wird dies Auskunft darüber geben, ob die Behandlung mit Betaferon diesen Effekt umkehren kann. Bei Störungen der Blut-Hirn-Schranke, wie sie bei akuten MS-Schüben auftreten, könnten diese Serumfaktoren dann eine Regeneration und Remyelinisierung fördern.

2 Material

2.1 Patienten

In dieser Studie wurden 20 unbehandelte und 20 IFN- β behandelte MS-Patienten mit schubförmiger MS, gemäß der McDonald Kriterien (McDonald et al., 2001), aufgenommen.

Weitere 15 unbehandelte Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, wobei die Blutentnahme vor sowie 6 Monate und mind. 12 Monate nach Therapiebeginn erfolgte (s. Tab. 3).

Alle behandelten Patienten erhielten jeden zweiten Tag subkutan Betaferon (IFN- β -1b, Schering/ Bayer). Die Blutentnahme erfolgte 14-18 h nach der letzten Gabe von IFN- β . Keiner der unbehandelten Patienten hatte sich in den letzten 6 Monaten vor Studienbeginn immunmodulatorischen oder immunsuppressiven Behandlungen unterzogen. Keine der Blutentnahmen erfolgte im selben Monat nach einem Schub und/ oder einer Behandlung mit Steroiden. Der Krankheitsverlauf der Patienten wurde während der gesamten Studie aufgezeichnet. Dabei wurden die klinischen Symptome und der Behinderungsgrad nach der Kurtzke-Skala (EDSS) aufgezeichnet (Kurtzke, 1983). Es wurden zusätzlich Blutproben von 20 Gesunden, nicht an MS erkrankten Personen abgenommen, die als Kontrollen dienten. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover überprüft und bewilligt. Die an dieser Studie beteiligten Personen wurden über den Ablauf der Studie informiert und unterzeichneten eine Einverständniserklärung.

Tabelle 1A Biometrische Daten der ersten Patientengruppe (Querschnittstudie)

	n	m/w	Alter in Jahren	Dauer der MS in Jahren	EDSS	Schubrate		Dauer der IFN- β Beh. in Monaten
						vor Beh.	während Beh.	
Gesunde	20	9/11	36.2 \pm 2.4					
Unbehandelte MS-Patienten	20	5/15	36.2 \pm 2.9	3.1 \pm 1.0	1,6	1.3 \pm 0.2		
Behandelte MS-Patienten	20	8/12	37.6 \pm 1.9	5.2 \pm 1.2	2,6	1.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.3	31.4 \pm 6.5

Tabelle 1B Biometrische Daten der zweiten Patientengruppe (Verlaufsstudie)

	n	m/w	Alter in Jahren	Dauer der MS in Jahren	EDSS			Schubrate		Dauer der IFN- β Beh. in Monaten
					Mo 0	Mo 6	Mo 12	vor Beh.	während Beh.	
MS-Patienten	15	5/10	35.6 \pm 2.7	6.0 \pm 1.6	2.2	1.7	1.8	1.5 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3	16.2 \pm 1.3

Beh. = Behandlung, m = männlich, w = weiblich

Tab. 3: Biometrische Daten der Patienten

2.2 Zelllinien

A2B5 Hybridoma (Klon 105)	ATCC, Manassas, USA
GalC Hybridoma (Klon IC-07)	ECACC über Sigma-Aldrich, Steinheim
B104 Neuroblastoma	Salk Institute, La Jolla, CA, USA

2.3 Verwendete Tiere

Sprague Dawley Ratten	CrIT:CD, von Charles River, England gezüchtet im Tierhaus der MHH
-----------------------	--

2.4 Allgemeine Chemikalien

Borat-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5'-Bromo-2'-Deoxy-uridin (BrdU)	Roche, Indianapolis, USA
4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid (DAPI)	Molecular Probes, Niederlande
Diaminobenzidin (DABCO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Darmstadt
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich, Steinheim Roche, Indianapolis, USA
Ethanol (EtOH)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Glycerol	Fluka, Steinheim
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Mowiol	Calbiochem über Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-Propanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-lysin Lösung (PLL)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA (TE)	PAA, Pasching, Österreich

2.5 Zellkulturmedien, Wachstumsfaktoren und Zusätze

Biotin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium + Glutamine + Glucose (D-MEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl) - Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin-Transferrin-Selenite (ITS)	BD Biosciences, Bedford, USA
Progesteron	Sigma-Aldrich, Steinheim
Putrescine Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3',5-Triiodo-L-Thyronin (T3)	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3',5,''-Tetraiodo-L-Thyronin (T4)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.6 Standardmedien, -lösungen und -puffer

<u>Standardmedium</u>	10% FBS (hitzeinaktiviert) 1% P/S (5000 Units/ 5000 µg/ml) ad D-MEM
<u>Serumfreies Medium</u>	1% ITS (5µg/ml Insulin, 50 µg/ml Transferrin, 30 nM Natriumselenit) 1% P/S ad D-MEM

B104-Medium

30% B104 CM (s. S. 27)
10 ng/ml Biotin
74 ng/ml Progesteron
16 µg/ml Putrescin
1% ITS
ad D-MEM

N2B3-Medium

10 ng/ml Biotin
74 ng/ml Progesteron
16 µg/ml Putrescin
400 ng/ml T3
400 ng/ml T4
1% ITS
ad D-MEM

Trituating Lösung

1% BSA
0,03 mg/ml DNase (Sigma-Aldrich)
0,5 mg/ml Trypsin Inhibitor
ad 1 x PBS

Borat-Puffer

0.1 g Borat-Salz
ad 100 ml dH₂O
pH-Wert 8.5

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies / Isotyp	Zielepitop	Firma/ Klon
A2B5 Monoklonal, 1:2	Maus IgM	Oligodendrozyten- vorläuferzellen	LGC Promochem, Teddington, UK ATCC CRL-1520
Anti-BrdU Polyklonal, 1:100	Maus IgG1	BrdU (DNS-Zellkern)	Roche, Indianapolis, USA BMC 9318
GalC Monoklonal, 1:2	Maus IgG3	Differenzierte Oligodendrozyten	ECACC IC-07
GFAP Polyklonal, 1:500	Kaninchen IgG	Astrozyten	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark Z 0334
OX42 Polyklonal, 1:100	Maus IgG2a	Mikroglia	Cedarlane, Ontario, Kanada CL042B

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Fluorochrom	Firma
Maus IgM, 1:100	Kaninchen	Cy3	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Maus IgG, 1:100	Kaninchen	Cy2	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Maus IgG2a, 1:500	Ziege	Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen IgG, 1:500	Ziege	Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe

2.8 Materialien und Geräte

2.8.1 Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Einfrrierhilfe	Thermo Scientific GmbH, Schwerte
Einmalhandschuhe Latex	Kimberly-Clark-Corporation Rosswell, USA
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Falcon-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschale Cellstar	Greiner, Frickenhausen
Multiwellplatten	Nunc, Wiesbaden
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark-Corporation Rosswell, USA
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Menasha, WI, USA
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Serum-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Millipore, Bedford, USA
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

2.8.2 Geräte

Autoklav, Varioklave 250T	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Inkubator	Heraeus, Osterode
Laborumlufttrockenschrank	Heraeus, Osterode
Lamin Air HB2472	Heraeus, Osterode
Pipetten	Gilson, Langenfeld Eppendorf, Hamburg
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttelinkubator	
Edmund Bühler KS-15 control und TH15	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Sterilbank	CEAG-Schirp Reinraumtechnik, Dortmund
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad, 1083	GFL, Burgwedel
Mikroskope	
Te Laval 31	Zeiss, Göttingen
Axiostar, Zeiss 1031-031	Zeiss, Göttingen
Stemi DCR	Zeiss, Göttingen
Leica DM LB und Leica Kamera DC300	Leica Microsystems GmbH, Bensheim
Zentrifugen	
Megafuge 2,0R	Heraeus, Osterode
Eppendorf centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Medien und Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der gemischten Gliazellkulturen, der B104 Neuroblastoma-Zelllinie und der beiden Hybridoma-Zelllinien A2B5 und GalC erfolgte im Standardmedium. Das hierfür verwendete FBS wurde für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert, anschließend aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Zum Waschen der Zellen wurde 1 x PBS verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

3.1.2 Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Kultivierung der B104-Neuroblastoma Zelllinie sowie die der Hybridoma-Zelllinien A2B5 und GalC erfolgte in Standardmedium. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert, um ein zu dichtes Wachstum in der Zellkulturflasche zu verhindern. Für das Ablösen der Zellen wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung verwendet mit einer Konzentration von 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA. Trypsin ist eine Serinprotease und katalysiert die hydrolytische Spaltung von Proteinen und Peptiden innerhalb des zu spaltenden Moleküls. Es werden vorwiegend basische Aminosäuren wie Lysin und Arginin gespalten. EDTA ist ein Komplexbildner und bindet zweiwertige Ionen wie Kalzium und Magnesium, die die zellbindenden Membranproteine stabilisieren. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37°C mit der Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit Standardmedium gestoppt und die Zellen bei 210 g für 5 min zentrifugiert. Nach Resuspension im Standardmedium wurden die Zellen in gewünschter Dichte in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Um die Zellen einzufrieren wurden diese in Standardmedium mit 5% DMSO aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Das DMSO ist eine kryoprotektive Substanz, die schädliche Einflüsse des Einfrierens, wie die Bildung von Eiskristallen, unterbindet. Die Zellen wurden anschließend mit einer Abkühlrate von 1°C pro Minute bis auf -80°C eingefroren. Das langsame Abkühlen der Zellen konnte mit Hilfe einer Einfrierhilfe, die mit

N-Propanol befüllt war, erreicht werden. Für eine Langzeitkonservierung wurden die Zellen am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Für eine Reaktivierung wurden die Zellen sofort nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff bei 37°C im Wasserbad unter Schwenken aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann 1/10 in Zellkulturmedium verdünnt und bei 210 g für 5 min zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde schließlich in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und zur Kultivierung in eine Zellkulturf Flasche überführt.

3.1.3 Zellzahl -und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden die Zellen in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Zum Zählen wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:2 mit Trypanblau verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau wurde verwendet, um die vitalen Zellen von den toten zu unterscheiden. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und werden blau gefärbt. Vitale Zellen bleiben dagegen ungefärbt, weil sie den Farbstoff ausschließen können.

3.1.4 Beschichtung von Zellkulturflaschen, Glasdeckgläschen und Well Platten mit Poly-L-Lysin

Poly-L-Lysin (Molekulargewicht $\leq 150,000$) ist ein synthetisches Molekül, das die Haftung von Zellen an Glas- oder Plastikoberflächen erhöht. Es bewirkt eine verbesserte Adhäsion, Ausbreitung sowie schnelleres Wachstum von Primärzellen.

Für die Beschichtung wurde zunächst eine 0,01%ige Poly-L-Lysin-Lösung in dH₂O hergestellt. Die Zellkulturflaschen wurden mit der Lösung für 1 h bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit sterilem dH₂O gespült. Die trockenen Zellkulturflaschen wurden steril verpackt und konnten bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden.

Die Glasdeckgläschen (12 mm Durchmesser) wurden vor der Beschichtung mit Poly-L-Lysin autoklaviert. Anschließend wurde pro Vertiefung einer 24-Well Platte ein Glasdeckgläschen platziert und mit Poly-L-Lysin bedeckt (ca. 80 µl Volumen). Nach 1 h wurden die Glasdeckgläschen schließlich zweimal mit sterilem dH₂O gewaschen. Nach dem Trocknen der letzten Wassertropfen waren die Glasdeckgläschen gebrauchsfertig.

Die 96-Well Platten wurden wie die Glasdeckgläschen mit 50 µl Poly-L-Lysin inkubiert, zweimal gewaschen und anschließend getrocknet. Dann konnten die Zellen in den Vertiefungen der Well Platte ausplattiert werden.

3.1.5 Produktion von Antikörpern aus Hybridoma-Zelllinien

3.1.5.1 A2B5 und GalC monoklonale Antikörper

Die Herstellung des Antikörpers A2B5 erfolgte aus der A2B5 Hybridoma-Zelllinie (Klon 105) und die des Antikörpers GalC aus der GalC Hybridoma-Zelllinie (Klon IC-07). Da die Hybridoma-Zelllinien Suspensionszellen sind, also frei im Nährmedium schwimmend wachsen, unterscheidet sich ein wenig die Kultivierungsmethode zu den adhärent wachsenden Zelllinien. Zunächst wurde die jeweilige Hybridoma-Zelllinie im Standardmedium kultiviert. Zur Produktion des Antikörpers wurden die Hybridoma-Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in serumfreiem Medium aufgenommen, die Hybridoma-Zellen gezählt und in einer Dichte von 2×10^6 in eine Zellkulturflasche von 75 cm² Fläche passagiert. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und für 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Der resultierende Hybridoma-Überstand wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.1.6 Herstellung von B104 konditioniertem Medium (B104 CM)

Die Kultivierung der Neuroblastoma-Zelllinie B104 erfolgte in dem Standardmedium. Für die Herstellung von B104 konditioniertem Medium (B104 CM) wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ in Zellkulturflasche (75 cm²) ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die B104-Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 13 ml serumfreies Kulturmedium wurde in jede Flasche pipettiert. Nach 72 h Inkubation mit dem serumfreien Medium wurde der Überstand abpipettiert und 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Das fertige B104 CM wurde steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

3.2 Primärzellkultur

3.2.1 Gewinnung der gemischten Gliazellkultur aus neugeborenen Ratten

Die gemischte Glia-Primärzellkultur wurde aus den Gehirnen von neugeborenen Sprague-Dawley Ratten gewonnen (McCarthy und de Vellis, 1980; Stangel und Bernard, 2003). Die Ratten wurden durch einen Nackenschnitt getötet und die Gehirne entnommen. In Petrischalen mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) und 10 % HEPES Puffer wurden die Meningen unter dem Mikroskop (Zeiss „Stemi DCR“) von den Gehirnen abpräpariert. Anschließend wurden die Gehirne zweimal in Hank's Balanced Salt Solution mit HEPES Puffer gewaschen, bevor sie mit Hilfe einer Rasierklinge zerkleinert wurden. Die Suspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 1891 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml 0,1% Trypsin resuspendiert und bei 37°C für 30 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml 0,001% DNase, das Röhrchen wurde mehrmals geschwenkt und erneut bei 1891 g für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und 1 ml Tritiating Lösung zugegeben. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden Glaspipetten mit unterschiedlich großen Öffnungen verwendet und die Zellsuspension mehrfach darin auf- und abpipettiert.

3.2.2 Kultivierung der gemischten Gliazellkultur

Die aus den Gehirnen der neugeborenen Ratten gewonnenen gemischten Gliazellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen (75 cm²) ausplattiert, wobei ein bis zwei Gehirne pro Zellkulturflasche verwendet wurden. Die gemischten Gliazellen wurden für sechs Tage in Standardmedium kultiviert (s. Abb. 2). Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage durch frisches Medium ersetzt. Nach sieben Tagen konnten die einzelnen Zelltypen (Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten) aus den gemischten Gliazellen gewonnen werden.

Für die Kultivierung der gemischten Gliazellkulturen auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläschen wurden die Zellen nach der Herstellung der Einzelzellsuspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und 0,4% Trypanblau-Lösung ausgezählt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^4 pro Glasdeckgläschen in 24-Well Platten ausplattiert und 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nachdem die Zellen adhärirt waren, wurden pro Well

500 µl Standardmedium hinzupipettiert.

Für die Kultivierung der gemischten Gliazellkulturen in Poly-L-Lysin beschichteten 96-Well Platten mit planem Boden wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^4 ausgesät. Der Vorgang erfolgte wie oben beschrieben bei der Kultivierung der gemischten Gliazellkulturen auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläschen.

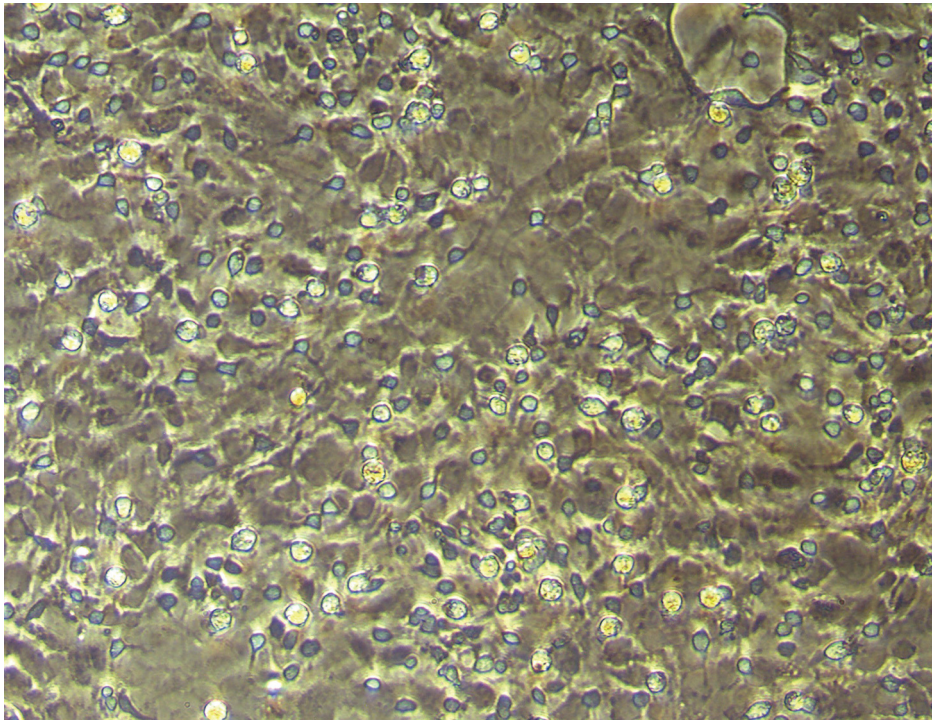


Abb. 2: Gemischte Gliazellkultur aus neugeborenen Ratten (7 Tage nach der Präparation)

3.2.3 Aufreinigung von Mikroglia

Die gemischten Gliazellkulturen wurden sieben Tage in Standardmedium kultiviert. Dabei entstand ein konfluenter Zellrasen, bestehend aus einer Astrozytenschicht, auf der sich Oligodendrozyten und Mikroglia bildeten (s. Abb. 2). Als erstes konnten die Mikroglia isoliert werden, da diese nur wenig an den anderen Zellen haften. Dafür wurden die Zellkulturflaschen für 2 h bei 180 rpm und 37°C geschüttelt (Edmund Bühler KS-15 control und TH15). Die durch den Schüttelvorgang abgelösten Mikroglia wurden abpipettiert und für 5 min bei 210 g zentrifugiert. Die aufgereinigten Mikroglia wurden in Standardmedium aufgenommen, gezählt und in einer Dichte von 5×10^2 auf Glasdeckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm ausplattiert.

3.2.4 Aufreinigung von Oligodendrozytenvorläuferzellen

Die Isolierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen erfolgte durch einen weiteren Schüttelvorgang bei 150 rpm für 16 h und 37°C. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und für 5 min bei 210 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in N2B3 Medium aufgenommen, in eine unbeschichtete Zellkulturflasche überführt und für 30 min in den Inkubator gestellt. Bei diesem Vorgang wurden die kontaminierenden Mikroglia und Astrozyten durch Anheftung an den unbeschichteten Boden der Zellkulturflasche entfernt, um eine reinere Kultur der Oligodendrozytenvorläuferzellen zu erzielen. Der Überstand mit den Oligodendrozytenvorläuferzellen wurde abgenommen und für 5 min bei 210 g zentrifugiert. Die Zellen wurden schließlich gezählt und in einer Dichte von 5×10^4 pro Vertiefung der 24-Well Platte, auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasdeckgläschen ausplattiert.

3.2.5 Aufreinigung von Astrozyten

Die Astrozyten konnten aus den gleichen gemischten Gliazellkulturen isoliert werden, nachdem die Mikroglia sowie die Oligodendrozyten durch einen weiteren Schüttelvorgang bei 180 rpm für 16 h bei 37°C entfernt wurden. Am Tag 11 der gemischten Gliazellkultur wurden die Zellen mit dem Antimitotikum Cytosine Ara-C ($10 \mu\text{m}$) für 72 h inkubiert, um die Proliferation der restlich verbliebenen Mikroglia und Oligodendrozyten zu verhindern. Nach der Inkubation wurde das Zellkulturmedium mit dem Antimitotikum Cytosine Ara-C abgenommen und die Astrozyten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend frisches Medium hinzugegeben. Am Tag 14 der gemischten Gliazellkultur konnten schließlich die Astrozyten mit Hilfe von 0,25% Trypsin/ 0,05% EDTA geerntet werden. Die Zellen wurden gezählt und in einer Dichte von 1×10^4 auf Glasdeckgläschen in 24-Well Platten ausgesät.

3.3 Gewinnung von Serum aus humanem Blut

Das Blut wurde in einem Serumröhrchen ohne Gerinnungshemmer abgenommen und für 45 min bei RT stehen gelassen. Nachdem das Blut geronnen war, erfolgte die Zentrifugation bei 1400 g für 10 min bei 4°C. Das Serum (Überstand) wurde sofort vom Blutkuchen abpipettiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die gewonnene Serummenge entsprach ca. einem Drittel des zentrifugierten Blutvolumens. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.4 Toxizitätsassay

3.4.1 Inkubation der gemischten Gliazellen mit humanem Serum

Die gemischten Gliazellen wurden in einer mit Poly-L-Lysin beschichteten 96-Well Platten mit planem Boden in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro Vertiefung ausplattiert. Die Zellen wurden zunächst 24 h mit je 150 μ l Standardmedium kultiviert, um ihnen ein sicheres Adhärieren am Boden zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Standardmedium inkubiert. Am vierten Tag wurden die Zellen wiederholt mit 1 x PBS gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit 10 % humanem Serum (in DMEM mit 1% P/S) von gesunden Kontrollen, MS Patienten sowie von IFN- β behandelten MS Patienten (je 100 μ l). Das mit humanem Serum versetzte Medium wurde am siebten Tag abgenommen und mit frischem Medium, das mit Serum des gleichen Patienten versetzt war, ersetzt. Es wurden jeweils Triplikate der jeweiligen Kondition angelegt. Triplikate von unbehandelten Zellen in unterschiedlicher Zelldichte (5000, 10000, 15000, 20000) wurden zusätzlich mitgeführt, damit eine Regressionsgerade erstellt werden konnte. Mit Hilfe dieser Regressionsgerade konnte jeder spektrophotometrisch gemessene Extinktionswert der jeweiligen Zellzahl zugeordnet werden. Somit konnte das spezifische Wachstumsverhalten der Zellen nach Inkubation mit dem humanen Serum ermittelt werden. Bei diesem Versuch diente als Kontrolle die Inkubation der Zellen mit dem Standardmedium.

3.4.2 Bestimmung der Toxizität bzw. Proliferation

Es gibt eine Vielzahl von Methoden, um Zellviabilität und den Zelltod zu messen. Ein geeigneter nichtradioaktiver Test ist der hier verwendete alamarBlue™-Assay. Der aktive Inhaltsstoff des alamarBlue™-Reagents, Resazurin, ist ein nicht-toxischer, zellpermeabler, blauer Farbstoff (Ahmed et al., 1994). Die proliferierenden Zellen nehmen Resazurin auf und reduzieren es zu Resorufin (s. Abb. 3). Diese Reduktion geht mit einer Farbänderung von blau zu rot einher, welche spektrophotometrisch gemessen werden kann. Das Oxidations-Reduktions-Potential liegt bei +380 mV bei einem pH-Wert von 7 (25°C). Damit alamarBlue™ reduziert wird, muss es in die Zelle aufgenommen werden. Es kann nicht von Bestandteilen des Mediums reduziert werden. Die Reduktion des alamarBlue™ stellt somit ein indirektes Maß der Zellzahl dar, welches lineare Ergebnisse mit einer hohen Spezifität und Sensivität generiert (Nociari et al., 1998). Bei jedem Versuch wurden Kontrollen aus unbehandelten Zellen in unterschiedlicher Zelldichte mitgeführt, die zur Ermittlung der Regressionsgerade dienen. Aus der Regressionsgerade konnte dann schließlich die Zellzahl für jedes Well bestimmt werden. Somit wurde für jeden Versuch die Zellzahl in Prozent auf die unbehandelten Zellen als versuchsspezifische Kontrolle ermittelt, um Unregelmäßigkeiten im Zellwachstum auszugleichen. Die spektrophotometrische Messung erfolgte in einem 96-Well Plate Reader bei einer Wellenlänge von 620 nm.

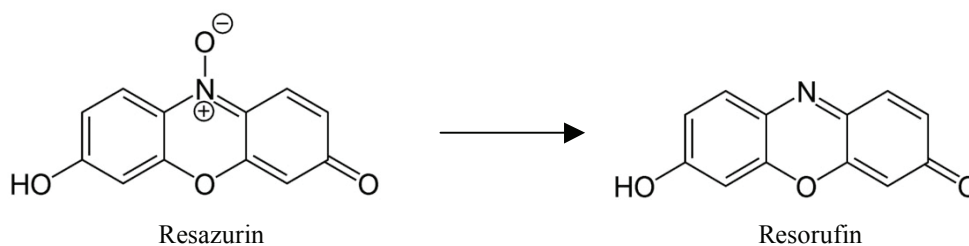


Abb. 3: Resazurin ist ein nicht-fluoreszierender blauer Farbstoff der zu Resorufin, einem rot fluoreszierenden Farbstoff durch proliferierende Zellen reduziert wird. Die Anzahl der produzierten Fluoreszenz ist proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen.

3.4.3 Statistische Auswertung der Daten des Toxizitätsassays

Für den Toxizitätsassay wurden vier voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Das Standardmedium diente dabei als Kontrolle und die einzelnen Gruppen wurden mit dieser verglichen. Für jedes Experiment wurde die Normalverteilung der Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Bei Normalverteilung der Werte wurde die statistische Signifikanz mit dem One-Way Repeated Measures Analysis of Variance und der Student-Newman-Keuls Methode berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Für die statistische Analyse wurde die SigmaStat Software V3.5 verwendet.

3.5 Immunozytochemische Färbungen

Bei den immunozytochemischen Färbungen wurden sekundäre Antikörper eingesetzt, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff, einem so genannten Fluorochrom, gekoppelt sind. Diese Methode der Immunfluoreszenz ist für Einfachdarstellungen eines Antigens sowie für Mehrfachdarstellungen unterschiedlicher Antigene in einem Präparat geeignet. Es lassen sich intrazelluläre sowie an der Zelloberfläche gebundene Proteine nachweisen. Dabei wird im ersten Schritt ein mono- oder polyklonaler Primärantikörper eingesetzt der an die gewünschten Proteine (Antigene) spezifisch bindet. Im zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper gegen den Antikörper der Spezies, aus dem der Primärantikörper stammt, eingesetzt. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluorochrom (Cy2, Cy3, FITC, o.ä.) konjugiert, der mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und dadurch Licht einer anderen Wellenlänge abstrahlt. Am Fluoreszenzmikroskop wird die für die Anregung des Fluorochroms notwendige Wellenlänge mit optischen Filtern isoliert und das einfarbige Licht auf das Objekt geleitet, worauf dieses zu fluoreszieren beginnt. Durch spezielle Vorrichtungen wird sichergestellt, dass nur das abgestrahlte Fluoreszenzlicht in das Okular des Mikroskops geleitet wird. Das gefärbte Präparat kann dann ausgewertet werden.

3.5.1 A2B5 und GalC – Doppelfärbung

Die A2B5 Hybridoma-Zellen (LGC Promochem ATCC CRL-1520, HB-29) produzieren den monoklonalen Antikörper A2B5. Dieser Antikörper bindet an die Oberfläche von Oligodendrozytenvorläuferzellen. Der Antikörper bindet in vitro hauptsächlich an das Gangliosid GT3 und an dessen O-acetylierte Derivate. Beide Antigene werden während der Differenzierung der Oligodendrozyten zu myelinbildenden Zellen herunterreguliert.

Die GalC Hybridoma-Zellen (clone IC-07 ECACC) produzieren den Antikörper GalC, der an spezifische Glykolipide, den Galaktoceramiden bindet. Galaktoceramide sind frühe Marker, die auf der Zelloberfläche von reifen Oligodendrozyten exprimiert sind.

Da sich beide Antigene auf der Zelloberfläche befinden, wurden die Zellen zunächst mit dem Primärantikörper behandelt und danach fixiert.

1. Waschen	2 x PBS
2. Primäre Antikörper	A2B5/GalC Hybridoma-Überstand 1:2 (v/v) 30 min bei 37°C und 5% CO ₂
3. Waschen	3 x PBS
4. Fixierung	4% PFA in PBS 15 min bei RT
5. Waschen	3 x PBS
6. Sekundäre Antikörper	Cy2 Kaninchen anti-Maus IgG Cy3 Kaninchen anti-Maus IgM je 1:100 (v/v) in PBS 45 min bei RT im Dunkeln
7. Waschen	3 x PBS 1 x dH ₂ O

8. Eindeckeln Mowiol mit 50 mg/ml DABCO und DAPI

3.5.2 A2B5 und BrdU - Doppelfärbung

Für den Proliferationsassay werden die Zellen mit Bromodeoxyuridin (BrdU) in einer Verdünnung von 1:1000 für 24 h inkubiert. BrdU ist ein Thymidinanalogon. Es wird während der DNS-Synthese in die DNS eingebaut. Durch den monoklonale Antikörper Anti-BrdU können Zellen identifiziert werden, die BrdU in ihre DNS eingebaut haben, d.h proliferieren.

1. Waschen 2 x PBS
2. Primärer Antikörper 1 A2B5 Hybridoma-Überstand
1:2 (v/v) in DMEM
30 min bei 37°C und 5% CO₂
3. Waschen 3 x PBS
4. Fixierung 4% PFA in PBS
15 min bei RT
5. Waschen 3 x PBS
6. Permeabilisierung Methanol (vorgekühlt bei -20°C)
20 min bei -20°C
7. Rehydrierung 2 x PBS
8. Denaturierung der DNS 2 M HCl
60 min bei 37°C
9. Neutralisierung der Säure 0.1 mol/l Borat Puffer pH 8.5
3 x 10 min bei RT

10. Waschen	3 x PBS
11. Primärer Antikörper 2	Anti-BrdU 1:100 (v/v) in PBS 60 min bei RT
12. Waschen	3 x PBS
13. Sekundäre Antikörper	Cy3 Kaninchen anti-Maus IgM Cy2 Kaninchen anti-Maus IgG je 1:100 (v/v) in PBS 45 min bei RT im Dunkeln
14. Waschen	3 x PBS 1 x H ₂ O
15. Eindeckeln	Mowiol mit 50 mg/ml DABCO und DAPI

3.5.3 GFAP - Astrozyten

GFAP ist ein 50 kDa großes Intermediärfilament im Zytoplasma von Astrozyten. Die Funktion ist bislang nicht vollständig geklärt. Vermutlich hat es einen Einfluss auf die Zellform und Motilität der Astrozyten.

1. Waschen	2 x PBS
2. Fixierung	4% PFA in PBS 15 min bei RT
3. Waschen	3 x PBS
4. Permeabilisierung	0,3% Triton X-100/ 5% Ziegen Serum in PBS 30 min bei RT

5. Waschen	3 x PBS
6. Primärer Antikörper	GFAP 1:100 (v/v) in PBS 60 min bei RT
7. Waschen	3 x PBS
8. Sekundärer Antikörper	Alexa 488 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) 1:250 (v/v) 45 min bei RT im Dunkeln
9. Waschen	3 x PBS 1 x H ₂ O
10. Eindeckeln	Mowiol mit 50 mg/ml DABCO und DAPI

3.5.4 OX42 - Mikroglia

Der Antikörper OX42 bindet am Komplement Rezeptor CR3. Das Antigen befindet sich auf der Oberfläche der Mikroglia. Aus diesem Grund wurden die Zellen zuerst mit dem Primärantikörper inkubiert und erst im Anschluss fixiert.

1. Waschen	3 x PBS
2. Primärer Antikörper	OX42 1:100 (v/v) in DMEM 30 min bei 37°C und 5% CO ₂
3. Waschen	3 x PBS
4. Fixierung	4% PFA in PBS 15 min bei RT
5. Waschen	3 x PBS

6. Sekundärer Antikörper	Alexa 488 Ziege anti-Maus IgG 2a 1:100 (v/v) in PBS 45 min bei RT im Dunkeln
7. Waschen	3 x PBS 1 x H ₂ O
8. Eindeckeln	Mowiol mit 50 mg/ml DABCO und DAPI

3.6 Proliferationsassay

3.6.1 Inkubation der gemischten Gliazellkulturen mit humanem Serum

Um die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen zu messen wurden die gemischten Gliazellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen in einer Dichte von 5×10^4 ausplattiert. Das Medium wurde am nächsten Tag mit frischem Standardmedium (DMEM/10% FBS) ersetzt. Am vierten und siebten Tag erfolgte die Inkubation mit 10% humanem Serum von gesunden Kontrollen und MS-Patienten in DMEM mit 1% P/S. Das Standardmedium diente als Kontrolle, mit dem in der Auswertung alle anderen Ergebnisse verglichen wurden. Das B104-Medium wurde als Positivkontrolle eingesetzt, da es die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen (Hunter und Bottenstein, 1990; Hunter und Bottenstein, 1991) fördert und die Differenzierung hemmt.

3.6.2 Bestimmung der Proliferation

Nach fünf Tagen Inkubation mit dem humanem Serum der gesunden Kontrollen und MS-Patienten wurden Doppelfärbungen mit den Markern A2B5 (Oligodendrozytenvorläuferzellen) und BrdU (Proliferation) durchgeführt. Die Proliferation wurde quantifiziert, indem die absolute Anzahl an A2B5 positiven und die A2B5/ BrdU doppelt positiven Zellen in fünf Gesichtsfeldern pro Deckgläschen ausgezählt wurde. Dabei wurde eine 40fache Vergrößerung des Leica DM LB Mikroskops verwendet. Der Proliferationsindex zeigt den Anteil der proliferierenden Vorläuferzellen zu der Gesamtpopulation der A2B5 positiven

Oligodendrozytenvorläuferzellen. In Abb. 8 wird die Morphologie BrdU-positiver und A2B5 positiver Oligodendrozytenvorläuferzellen dargestellt (s. Abb. 8).

3.6.3 Statistische Auswertung der Proliferationsdaten

In dem ersten Proliferationsassay wurden 10% und 15% humanes Serum mit der Kontrolle (Standardmedium) verglichen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test untersucht. Anschließend wurde der One-Way Analysis of Variance und die Student-Newman-Keuls Methode durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen.

Für die weiteren Proliferationsassays wurden Seren von unbehandelten, behandelten MS-Patienten und die Kontrollen miteinander verglichen. Es wurden Zellen von 7-11 voneinander unabhängigen Präparationen gefärbt. Es wurden fünf Gesichtsfelder pro Deckgläschen gezählt. Als Kontrolle diente das Standardmedium und die einzelnen Gruppen wurden mit dieser verglichen.

Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test überprüft. Die Normalität der gepaarten Proben wurden durch Arcsin Square Root Transforming für die Stabilisierung der Varianzen erreicht. Die statistische Signifikanz für ungepaarte Daten wurde mit dem One-Way Analysis of Variance Test ermittelt. Für die gepaarten Daten wurde der One-Way Repeated Measures Analysis of Variance mit dem Tukey's Test durchgeführt. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Die statistische Analyse wurde mit der SigmaStat Software V3.5 durchgeführt.

3.7 Differenzierungsassay

3.7.1 Ausplattieren der einzelnen Gliazelltypen und Inkubation mit humanem Serum

Für den Differenzierungsassay wurden 1×10^4 Astrozyten und 5×10^2 Mikroglia auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasdeckgläschen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden 2×10^4 Oligodendrozytenvorläuferzellen auf die Astrozyten-Mikroglia-Schicht ausgesät. Die Kultivierung erfolgte zunächst mit Standardmedium. Das Medium wurde am ersten und

dritten Tag nach dem Ausplattieren der Oligodendrozytenvorläuferzellen abgenommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit N2B3-Medium inkubiert, das mit 10% Serum von gesunden Kontrollen und MS-Patienten versetzt worden war. Als Kontrollen dienten das Standardmedium und das N2B3-Medium mit 10% FBS. Am sechsten Tag nach dem Ausplattieren der Oligodendrozytenvorläuferzellen wurde der Differenzierungsassay durchgeführt.

3.7.2 Bestimmung der Differenzierung

Um die Differenzierung der Oligodendrozyten zu bestimmen wurden Doppelfärbungen mit den Markern A2B5 (Oligodendrozytenvorläuferzellen) und GalC (differenzierte Oligodendrozyten) durchgeführt (s. Abb. 11). Die Anzahl an A2B5 und GalC positiven Zellen wurde pro Deckgläschen in fünf Gesichtsfeldern bei einer 40fachen Vergrößerung (Leica DM LB Mikroskop) ausgezählt. Der Differenzierungsindex stellt das Verhältnis der differenzierten Zellen (GalC positiv) zu den Vorläuferzellen (A2B5 positiv) dar.

3.7.3 Statistische Auswertung der Differenzierungsdaten

Der Differenzierungsassay wurde mit Zellen von drei bis fünf voneinander unabhängigen Präparationen durchgeführt. Dabei wurden je Deckgläschen fünf Gesichtsfelder ausgezählt. Die statistische Auswertung der Differenzierungsdaten erfolgte mit Hilfe der SigmaStat V3.5 Software. Der Kolmogorov-Smirnov Test diente zur Überprüfung auf Normalverteilung. Für gepaarte Proben wurde der Student's T-Test angewendet. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurde der Kruskal-Wallis One-way Analysis of Variance durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Toxizität von humanem Serum auf Oligodendrozytenvorläuferzellen

4.1.1 Toxische Konzentration von humanem Serum

Zu Beginn des Experiments, wurden isolierte Oligodendrozytenvorläuferzellen mit Serum unterschiedlicher Konzentrationen in Medium inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass das humane Serum (HS) bereits in niedrigen Konzentrationen toxisch auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen wirkt. Daraufhin wurden die Oligodendrozytenvorläuferzellen zusammen mit Astrozyten und Mikroglia kultiviert, um den toxischen Effekt des HS zu reduzieren. Es wurden fünf verschiedene Konzentrationen (5%, 10%, 15%, 20%, 30% HS) getestet. Nach fünf Tagen Inkubation wurde ein alamarBlue™-Assay durchgeführt, um die Proliferation der gemischten Gliazellen zu bestimmen. Die Messungen lieferten das Ergebnis, dass die Proliferation der gemischten Gliazellen ab einer Konzentration von 20% HS um ca. 13% signifikant gehemmt wird ($p = 0,036$, Kontrolle vs. 20% HS). Nach Inkubation der Gliazellen mit 30% HS wurde die Proliferation um ca. 15% inhibiert ($p = 0,018$, Kontrolle vs. 30% HS). Die Konzentrationen von 5% bis 15% HS stellten eine optimale nicht-toxische Konzentration dar (s. Abb. 4).

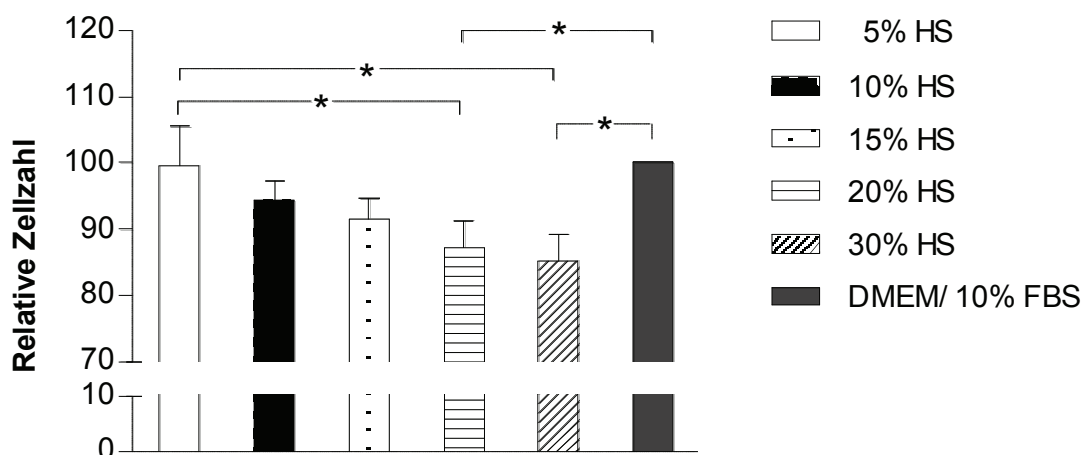


Abb. 4: Untersuchung der Toxizität von humanem Serum auf die gemischten Gliazellen mittels alamarBlue™-assay

4.1.2 Vergleich von 10% und 15% humanem Serum auf die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen

In einem weiteren Versuch sollte entschieden werden, welche Konzentration des HS zur Inkubation der gemischten Gliazellkulturen sich am besten eignet, ohne die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen zu beeinträchtigen. Hierfür wurden 50.000 gemischte Gliazellen auf einen Glasdeckgläschen (12 mm) ausplattiert und für fünf Tage mit jeweils einer Konzentration von 10% und 15% HS inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass weder 10% noch 15% HS die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen signifikant hemmen und sich somit als geeignet darstellen. Für die Durchführung der Experimente wurde eine Konzentration von 10% HS gewählt, da die Proliferationsrate von 10% HS die der Kontrolle (Standardmedium mit 10% FBS) entsprach (s. Abb. 5).

Ausserdem wurden die gemischten Gliazellkulturen immunzytochemisch gefärbt, um die Dichte der einzelnen Gliazellpopulationen und deren Verteilung zu begutachten (s. Abb. 6 und 7).

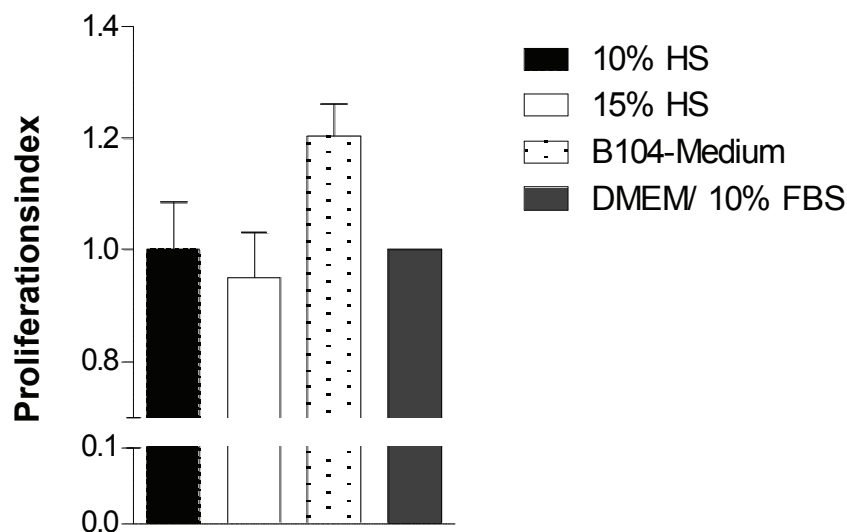


Abb. 5: Proliferationsassay: Vergleich der Proliferationsrate von Oligodendrozytenvorläuferzellen mittels BrdU-Inkorporation nach Inkubation mit 10% HS bzw. 15% HS.

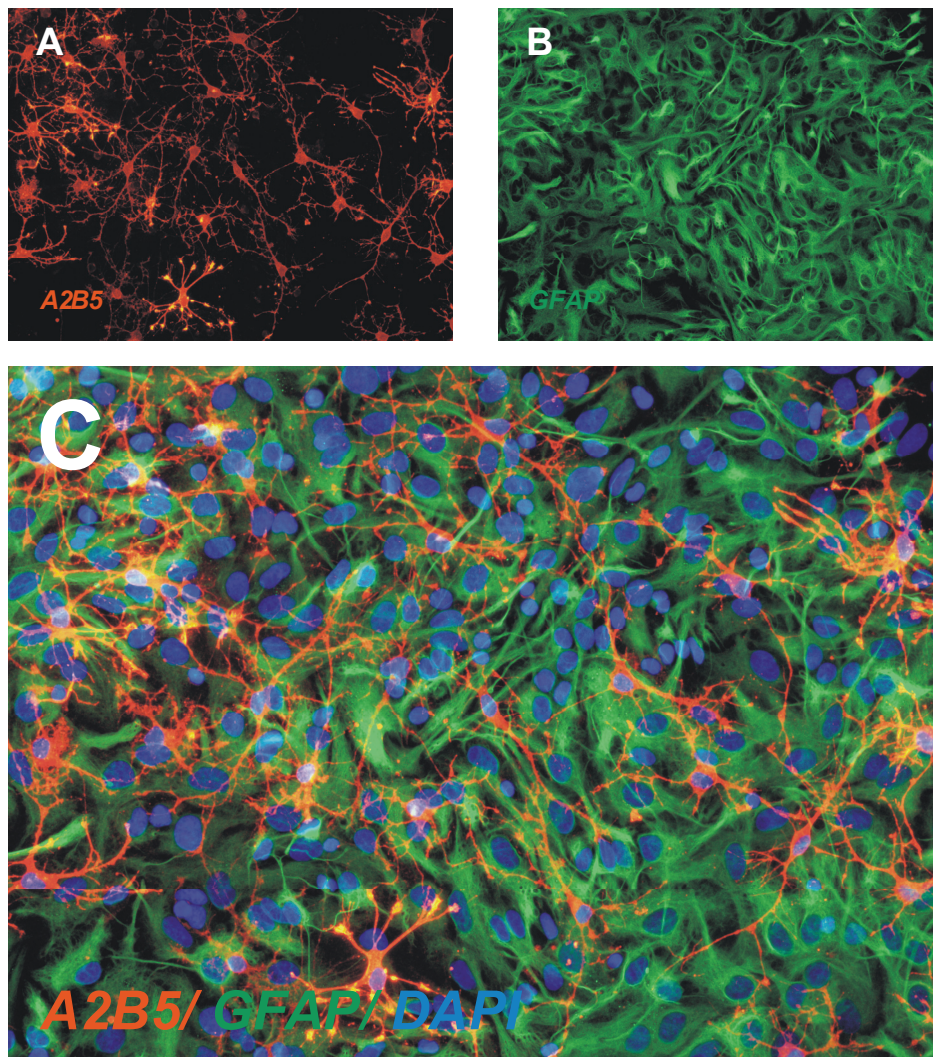


Abb. 6: Immunzytochemische Färbung der Gliazellkultur in 20facher Vergrößerung. (A) Nachweis der Oligodendrozytenvorläuferzellen mit dem Antikörper A2B5. (B) Färbung der Astrozyten mit GFAP. (C) Färbung der gemischten Gliazellkultur mit A2B5, GFAP und DAPI (Nukleus).

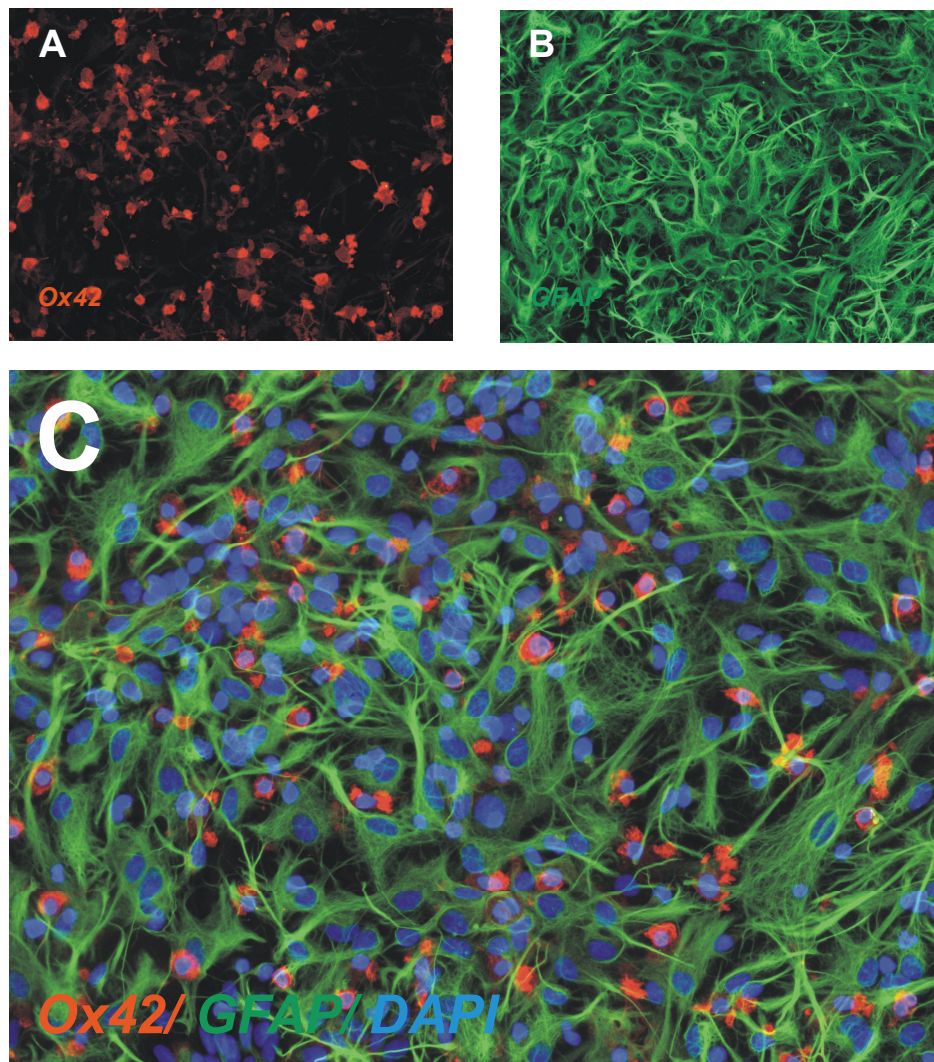


Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbung der gemischten Gliazellkultur in 20facher Vergrößerung. (A) Nachweis der Mikroglia mit dem Antikörper OX42. (B) Färbung der Astrozyten mit GFAP. (C) Färbung mit den Markern OX42 (Mikroglia), GFAP (Astrozyten) und DAPI (Nukleus).

4.2 Proliferationsassay

4.2.1 Einfluss von Seren unbehandelter Multiple Sklerose-Patienten auf die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen

Zunächst wurde der mögliche Einfluss der Seren von IFN- β unbehandelten MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen untersucht. Hierfür wurden gemischte Gliazellkulturen für fünf Tage mit Medium inkubiert, das mit 10% Serum versetzt worden war. Es wurden jeweils 20 Seren von unbehandelten MS-Patienten und 20 Seren von gesunden Kontrollen untersucht.

Die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen konnte anhand der BrdU-Inkorporation ermittelt werden (s. Abb. 8). Die Proliferationsrate wurde aus der Anzahl der BrdU-positiven Oligodendrozytenvorläuferzellen im Vergleich zur gesamten Population der A2B5-positiven Oligodendrozytenvorläuferzellen errechnet. Das Standardmedium diente dabei als Kontrolle. Bei jedem Versuch wurde der Proliferationsindex der jeweiligen Probe auf den der Kontrolle bezogen, damit Unregelmäßigkeiten im Zellwachstum ausgeglichen werden konnten. Das B104-Medium diente in diesem Versuchsansatz als Positivkontrolle.

Die Oligodendrozytenvorläuferzellen, die mit Serum von unbehandelten MS-Patienten behandelt worden waren zeigten eine signifikant geringere Proliferationsrate, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($p = 0,03$, s. Abb. 9).

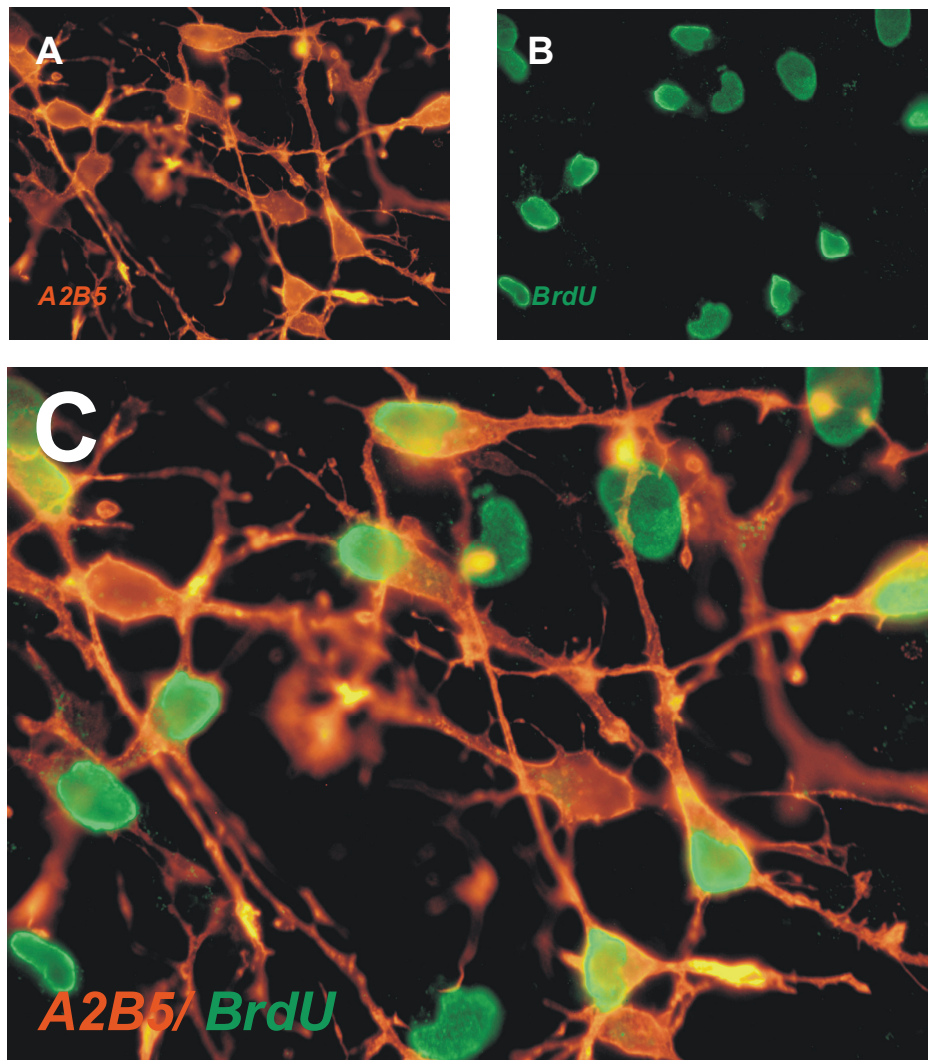


Abb. 8: Proliferationsassay: Immunzytochemische Färbung der Oligodendrozytenvorläuferzellen in gemischter Gliazellkultur in 100facher Vergrößerung. (A) Oligodendrozytenvorläuferzellen, die mit dem Antikörper A2B5 angefärbt sind. (B) Proliferierende Zellen, dargestellt mittels BrdU-Antikörper. (C) Doppelfärbung der gemischten Gliazellkultur mit den Antikörpern A2B5 und BrdU.

4.2.2 Interferon- β Behandlung kann dem inhibierenden Effekt des Serums von Multiple Sklerose-Patienten entgegenwirken

Die gemischten Gliazellen wurden mit Serum von IFN- β behandelten MS-Patienten inkubiert, um zu untersuchen, ob der inhibierende Effekt des MS-Serums moduliert werden kann.

Die Seren, die eingesetzt wurden, stammten aus einem Patientenkollektiv, das mindestens 12 Monate mit IFN- β behandelt worden war. Die Inkubation mit diesen Seren führte zu einer erhöhten BrdU-Inkorporation in den Oligodendrozytenvorläuferzellen ($p > 0,05$), im Vergleich zu den Seren IFN- β unbehaltener MS-Patienten (s. Abb. 9). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Seren IFN- β behaltener MS-Patienten und der Seren gesunder Kontrollen festgestellt werden. Zusammenfassend kann die Behandlung der MS-Patienten mit IFN- β die hemmende Wirkung des MS-Serums zumindest teilweise wiederherstellen.

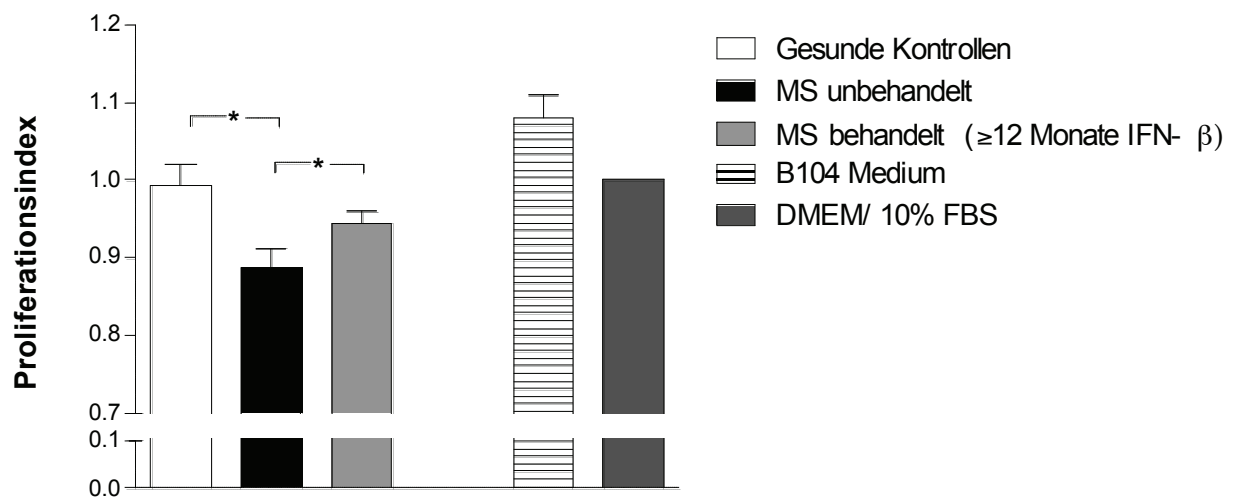


Abb. 9: Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen in gemischten Gliazellkulturen nach Inkubation mit 10% Serum von 20 gesunden Individuen, 20 IFN- β unbehaltener MS-Patienten und 20 IFN- β behaltener MS-Patienten. Der Proliferationsindex zeigt den Anteil der proliferierenden Oligodendrozytenvorläuferzellen zu der Gesamtpopulation der A2B5 positiven Zellen. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

4.2.3 Der Effekt einer Interferon- β Therapie auf die Oligodendrozytenproliferation ist nach 12 Monaten evident

In einem zweiten Versuchsansatz wurden Seren eines weiteren Patientenkollektivs untersucht. Hierfür wurde von 15 MS-Patienten Blut zur Serumgewinnung jeweils vor, 6 Monate und mindestens 12 Monate nach dem Beginn der IFN- β -Behandlung abgenommen. Vergleichbar mit den Ergebnissen des ersten Versuchsansatzes konnte eine signifikante Erhöhung ($p = 0,04$) der Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen nach einer 12monatigen Therapie mit IFN- β festgestellt werden, im Vergleich zu einer Therapiedauer von 6 Monaten (s. Abb. 10).

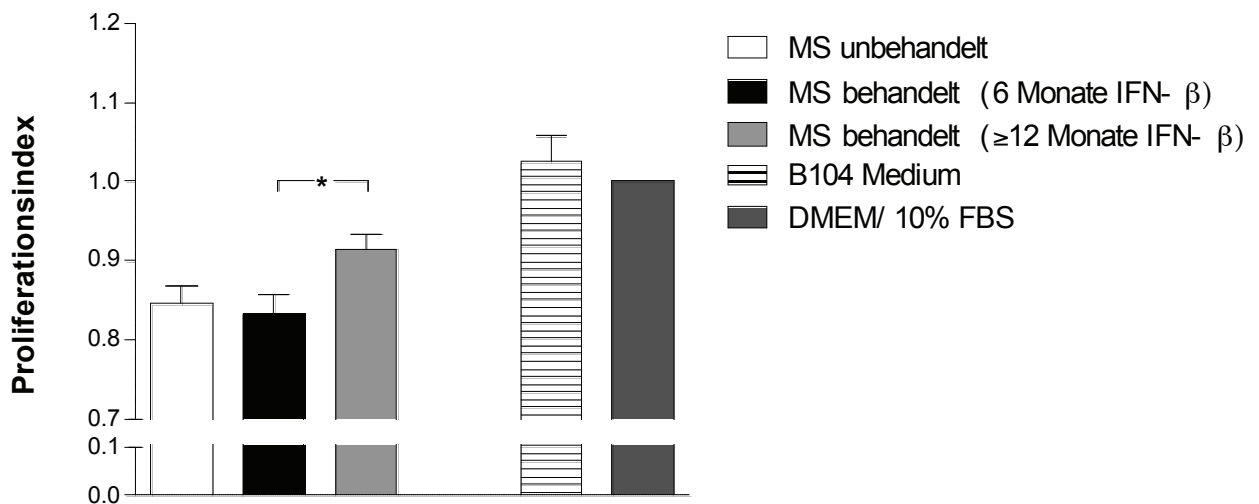


Abb. 10: Effekte von 15 MS-Patientenserum vor, 6 Monate und ≥ 12 Monate nach Beginn der IFN- β -Behandlung auf die Proliferationsrate von Oligodendrozytenvorläuferzellen in gemischten Gliazellkulturen.

4.3 Differenzierungsassay

4.3.1 Die Differenzierung der Oligodendrozyten wird nicht von Serum unbehandelter und Interferon- β behandelter Multiple Sklerose-Patienten beeinflusst

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Seren IFN- β un behandelter MS-Patienten und behandelter MS-Patienten einen zusätzlichen Einfluss auf die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen haben. Die Oligodendrozytenvorläuferzellen wurden mit Astrozyten und Mikroglia ko-kultiviert und für fünf Tage mit Seren von 20 gesunden Kontrollen, 20 un behandelten MS-Patienten und 20 behandelten MS-Patienten, die mindestens 12 Monate mit IFN- β behandelt worden waren, inkubiert. Als Kontrolle diente das N2B3-Medium, welches mit 10% FBS versetzt wurde. In jeder Versuchsreihe wurde der Differenzierungswert der jeweiligen Gruppe auf den der Kontrolle bezogen, damit Unregelmäßigkeiten im Zellwachstum ausgeglichen werden konnten.

Nach der Inkubation mit den Seren der einzelnen Gruppen wurden die Oligodendrozytenvorläuferzellen mit den Markern für unreife (A2B5) und reife Oligodendrozyten (GalC) gefärbt und ausgezählt (s. Abb. 11). Eine Tendenz zu einer erhöhten Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen durch die Inkubation mit Seren IFN- β un behandelter MS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen konnte beobachtet werden. Das Serum von IFN- β behandelten MS-Patienten führte zu einer Inhibierung der Differenzierungsrate. Dennoch war der Unterschied zwischen den Gruppen statistisch nicht signifikant (s. Abb. 12).

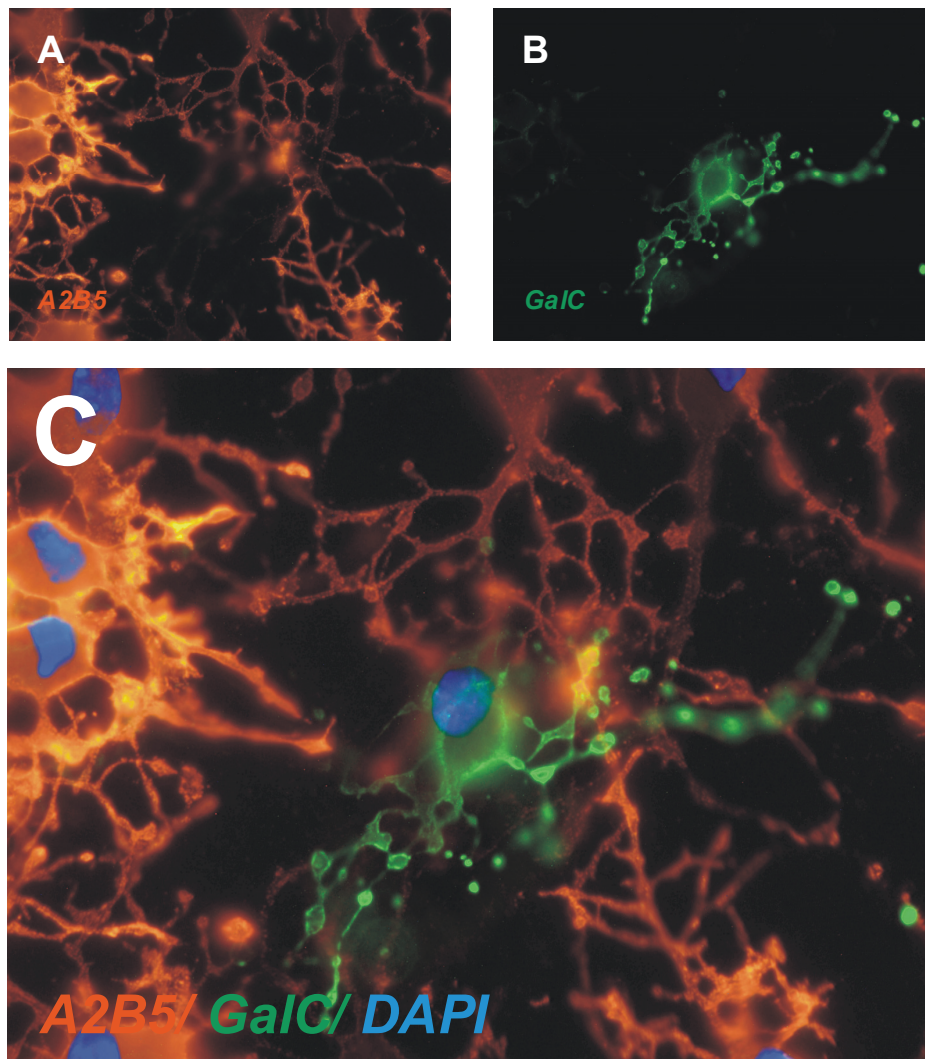


Abb. 11: Differenzierungsassay: Immunzytochemische Färbung der Oligodendrozytenvorläuferzellen in gemischter Gliazellkultur in 100facher Vergrößerung. (A) Oligodendrozytenvorläuferzellen, die mit dem Antikörper A2B5 angefärbt sind. (B) Differenzierter Oligodendrozyt, dargestellt mit dem Marker GalC. (C) Färbung der Oligodendrozyten mit den Antikörpern A2B5, GalC und DAPI.

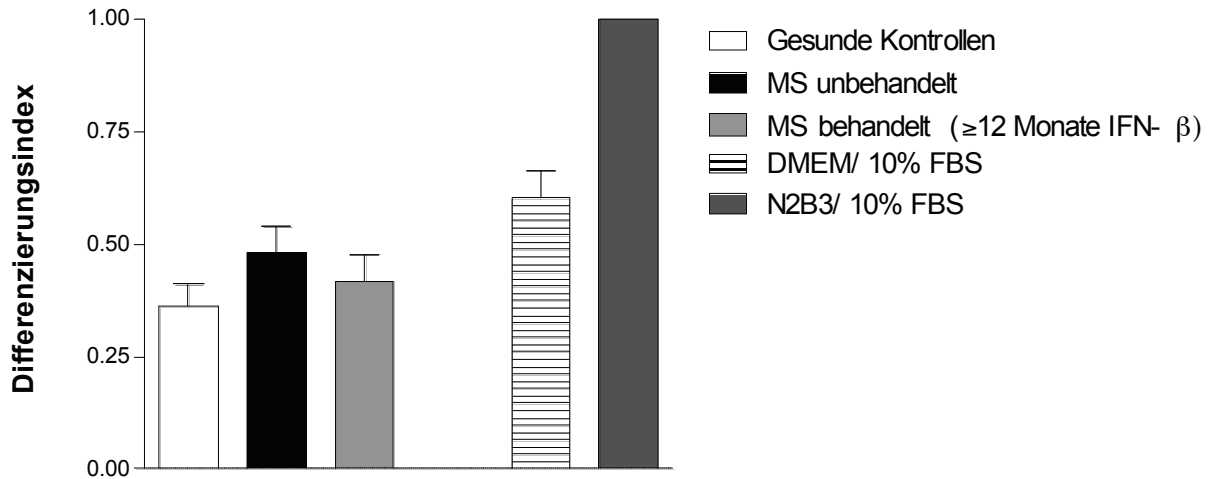


Abb. 12: Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen in gemischten Gliazellkulturen in Anwesenheit von 10% humanem Serum. Der Differenzierungsindex zeigt das Verhältnis von differenzierten Oligodendrozyten (GalC positiv) zu den Oligodendrozytenvorläuferzellen (A2B5 positiv). Gezeigt werden die Effekte der Seren von gesunden Individuen, unbehandelten MS-Patienten und behandelten MS-Patienten (≥12 Monate IFN-β-Behandlung).

4.3.2 Die IFN-β-Therapie zeigt keinen Effekt auf die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen

Im zweiten Versuchsansatz wurden die Oligodendrozytenvorläuferzellen, die mit Astrozyten und Mikroglia ko-kultiviert wurden, mit den Seren von 15 MS-Patienten vor und nach 6 Monaten einer IFN-β-Therapie inkubiert. Auch hier konnte kein Unterschied in der Differenzierungsrate der beiden Gruppen beobachtet werden, womit der Einfluss einer IFN-β-Therapie auf die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen ausgeschlossen werden konnte (s. Abb. 13).

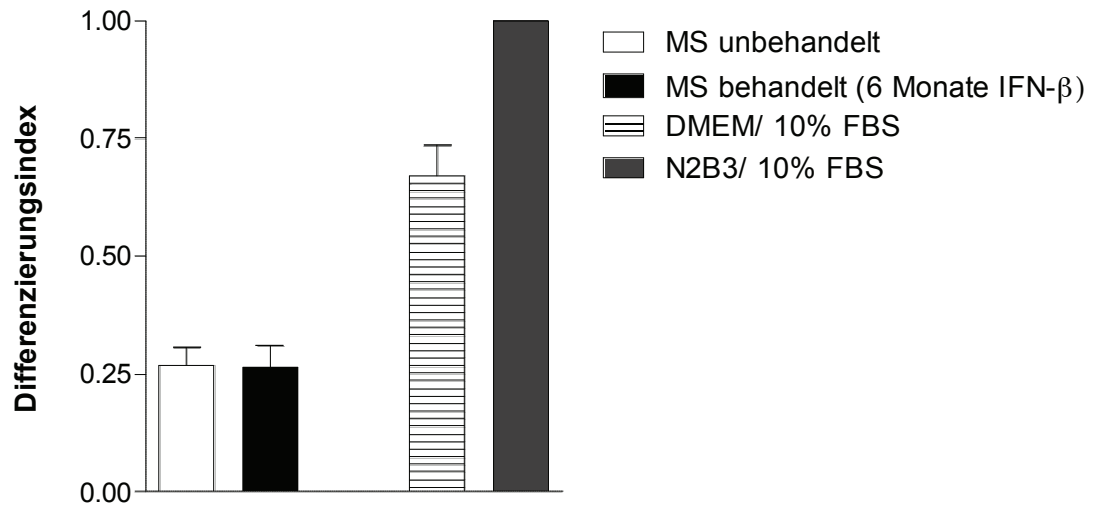


Abb. 13: Inkubation der gemischten Gliazellen mit Serum von 15 MS-Patienten vor und 6 Monate nach Beginn einer IFN- β -Therapie. Gezeigt werden die Effekte dieser Seren auf die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen.

5 Diskussion

MS ist eine entzündliche Erkrankung des ZNS, die zu einer Entmarkung der Nerven führt. Der Ursprung dieser Erkrankung ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass Umweltfaktoren wie Sonnenlicht, Vitamin-D-Mangel, Nikotin, Abgase, elektromagnetische Strahlung, aber auch genetische Prädisposition eine Rolle spielen (Fugger et al., 2009; Hernan et al., 2005; Marrie, 2004; Mikaeloff et al., 2007; Milo und Kahana, 2009). Zusätzlich werden Viren und Bakterien als Auslöser diskutiert. In Verbindung mit der Genetik wird nach Hinweisen für den Grund dieser Erkrankung in chromosomalen Regionen gesucht, die eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Integration viraler DNS nachweisen.

Obwohl die Ätiologie dieser Erkrankung nicht bekannt ist, gibt es mehrere Theorien. Die berühmteste und weitverbreiteste Theorie ist, dass MS eine Autoimmunerkrankung ist. Diese wird gekennzeichnet durch die CD4⁺-T-Zell-vermittelte Immunreaktion gegen das Myelin und die Oligodendrozyten (Booss et al., 1983; Hauser et al., 1986; Kreth et al., 1982; Nyland et al., 1982; Platten und Steinman, 2005; Traugott et al., 1983). Das histopathologische Hauptmerkmal ist die entzündliche Demyelinisierung und der axonale Schaden mit multifokaler perivaskulären ZNS-Infiltration von mononukleären Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen (Hemmer et al., 2002; Prat und Antel, 2005; Steinman et al., 2002). Die Theorie besagt, dass die Autoaktivierung der T-Zellen peripher erfolgt und gegen ein Protein gerichtet ist, welches dem Myelin ähnelt. Hughes et al. (2003) konnten eine erhöhte Anzahl an Antikörpern gegen bakterielle Antigene der Spezies *Acinetobacter* und *Pseudomonas aeruginosa* in MS-Patienten nachweisen. In einer weiteren Studie konnten sie demonstrieren, dass diese bakteriellen Antigene mit Peptiden der Myelinproteine kreuz reagieren. Ob molekulare Mimikry eine Rolle in der MS-Pathogenese spielen oder diese bakteriellen Infektionen als Trigger dienen ist noch ungewiss. Weitere infektiöse Erreger, wie die *Chlamydia pneumoniae* (Sriram et al., 1998), das Human Herpes Simplex Virus 6 (Soldan et al., 1997) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) (Serafini et al., 2007) haben sich zusätzlich als relevant für die MS herausgestellt. Eine Pentapeptid-Sequenz des nukleären EBV-Antigens ist homolog mit dem Epitop eines Myelinproteins, dem Myelin Basic Protein (MBP). Das EBV ist ein B-lymphotropisches humanes DNS Virus, das weit verbreitet ist und besonders im frühen Kindesalter zu einer asymptomatischen persistenten Infektion führt. Es hat eine Besonderheit, die die Rolle in der MS plausibel macht. Der Kontakt mit EBV führt zu einer persistierenden B-Zell-Infektion. Die Infektion von ruhenden B-Zellen führt zur

Aktivierung und Proliferation dieser Zellen. Die infizierten proliferierenden B-Zellen werden von EBV spezifisch zytotoxischen CD8⁺-Zellen eliminiert. Die latent infizierten nicht-proliferierenden B-Zellen persistieren dagegen. Das könnte theoretisch erklären wie EBV die Bildung von Myelin-spezifischen autoreaktiven T-Zellen in der MS stimulieren kann (Milo und Kahana, 2009). Somit kann eine infektiöse Erkrankung, die auf ein persistierendes oder ein latentes Virus zurückzuführen ist, ebenfalls als Grund für die MS nicht ausgeschlossen werden (Gilden, 2005).

Genomweite Assoziationsstudien werden durchgeführt um den Zusammenhang von Genen und der MS zu finden. Die MHC Region ist zurzeit die wichtigste genetische Region und verleiht ein viel größeres Risiko MS zu entwickeln, als alle anderen bekannten Loci. Obwohl die MHC Region sich als einzige abhebt MS zu entwickeln, gibt es viele weitere nicht-MHC genetische Varianten, die an der Krankheits-Suszeptibilität beteiligt sind. Es wurden mindestens 16 nicht-MHC Gene in den letzten zwei Jahren identifiziert. Sie werden als immunologische, neuronale oder aber als Gene kategorisiert, die keine vorhersehbare Rolle in der MS spielen. Diese neuen genetischen Assoziationen unterstützen die Ansicht, dass die MS eine immunvermittelte Erkrankung ist, in der T-Zellen und inflammatorische Antworten dominieren und liefern gleichzeitig den Beweis, dass die Neurodegeneration auch durch Varianten in neuronalen Genen hervorgerufen wird (Fugger et al., 2009).

Es wurde bereits oft darüber diskutiert, ob MS eine Autoimmunkrankheit oder eine degenerative Erkrankung ist. Henderson et al. (2009) lieferten vor kurzem einen histopathologischen Beweis der die Auffassung stützt, dass MS eher eine primär degenerative Erkrankung ist als eine Autoimmunkrankheit. Diese Arbeitsgruppe befasste sich mit der Observierung früher Läsionen von humanem Autopsiematerial. Dabei untersuchten sie die entzündliche Zellinfiltration in unterschiedlichen Bereichen der ausdehnenden MS-Läsionen. Sie fanden den Verlust von Oligodendrozyten in den frühesten Läsionen. Die infiltrierenden Makrophagen schienen die degenerierten bzw. toten Oligodendrozyten und das Myelin zu beseitigen. Aber am wichtigsten und am überraschendsten war das Ergebnis, dass nur eine geringe T- oder B-Zellen Infiltration zu sehen war, insbesondere die von CD4⁺-Zellen, welche einen wichtigen Mediator in der adaptiven Immunität darstellen. Diese sehr geringe Infiltration wurde in den frühen Läsionen beobachtet, wo Oligodendrozytenpathologie klar nachgewiesen und Myelindegeneration bereits vorhanden ist. Außerdem konnte adaptive Immunaktivität, durch die Anwesenheit von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Immunglobulin G-positive Plasmazellen hauptsächlich in Läsionen beobachtet werden in denen degenerative Oligodendrozyten und Myelin bereits von Makrophagen beseitigt worden

waren. Der frühe Verlust der Oligodendrozyten bzw. die Demyelinisierung sind somit nicht auf die adaptive Immunabwehr zurückzuführen. Vielmehr kann die beobachtete Anwesenheit der Mikroglia als eine physiologische Reaktion auf bereits zerstörte Zellen darstellen, wobei die Mikroglia dem Reinigen und Wiederaufbau dienen (Henderson et al., 2009).

Es bleibt unklar, ob der axonale Schaden auf die Demyelinisierung zurückzuführen ist oder durch einen primär aktiven zerstörenden Mechanismus erfolgt. Somit könnte die Autoimmunität bzw. die Entzündung eine sekundäre Reaktion auf einen nicht bekannten Prozess sein, der den Tod der Oligodendrozyten und damit den Myelinabbau auslöst (Vartanian, 2008; Waxman, 2005).

Wenn der Ursprung der MS nicht durch die primäre Autoimmunantwort auf Myelinproteine hervorgerufen wird, so stellt sich die Frage, was der Auslöser dieser Erkrankung sein könnte, der Oligodendrozytenverlust, Myelindegeneration und axonalen Schaden zur Folge hat.

Alix und Fern (2009) vermuten, dass Glutamat abhängige Exzitotoxizität eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Oligodendrozyten, Myelin und Axonen darstellt. Die Autoren berichten in ihrer Veröffentlichung über die Expression von N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid (AMPA)/ Kainate Rezeptor Untereinheit auf den Fortsätzen von Oligodendrozyten und unreifem Myelin in der zentralen weißen Substanz bei Ratten, sowie AMPA/ Kainate (aber nicht NMDA) Rezeptor Proteine entlang des Axolemmas von unreifen Axonen. Weitere Studien zeigten eine ähnliche Verteilung von Glutamat-Rezeptoren in Axonen und Glia der weißen Substanz von adulten Nagetieren und Menschen (Brand-Schieber und Werner, 2003a; Brand-Schieber und Werner, 2003b; Deng et al., 2004; Follett et al., 2004; Manning et al., 2008; Newcombe et al., 2008). Die Expression von AMPA-, Kainate- und NMDA-Rezeptoren macht die Oligodendrozyten anfälliger gegenüber der Toxizität durch Glutamat. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine chronische Exzitotoxizität ein plausibler Mechanismus für die Degeneration der weißen Substanz sein könnte, so wie das schon für mehrere neurodegenerative Erkrankungen der grauen Substanz postuliert wurde (Lipton und Rosenberg, 1994).

Sayre et al. (2008) beschreiben in ihrer Veröffentlichung, dass der Krankheitsverlauf bei der MS mit der axonalen Degeneration assoziiert werden kann. Mehrere Daten bezeugen, dass oxidativer Stress eine große Rolle in der MS-Pathogenese spielt und einen primären Beitrag zum neuronalen Sterben leistet (Bizzozero et al., 2005; Carlson und Rose, 2006; Shukla et al., 1977; Syburra und Passi, 1999). Der oxidative Stress wird als ein Ungleichgewicht zwischen biochemischen Prozessen dargestellt, der zur Folge hat, dass reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) in erhöhter Menge gebildet werden. ROS ist dafür bekannt alle zellulären

Biomakromoleküle (Lipide, Zucker, Proteine und Polynukleotide) zu zerstören. Diese Zerstörung kann zu sekundären Produkten führen, die genauso zerstörend wirken können wie die anfänglichen ROS. Es wurden erhöhte Konzentrationen dieser sekundären Produkte und/oder niedrigere Konzentrationen von antioxidativen Enzymen im Blut und Liquor von MS-Patienten gefunden (Calabrese et al., 1994; Ferretti et al., 2005; Greco et al., 1999; Karg et al., 1999; Koch et al., 2006).

Trotz einer Vielzahl von durchgeführten Studien und verschiedenster daraus resultierender Ansichten zur Entstehung der MS, ist die Ätiologie dieser Krankheit noch nicht eindeutig geklärt.

Für die Behandlung von MS sind zurzeit fünf Medikamente zugelassen: Interferon (Betaferon®, Rebif®, Avonex® und Extavia®), Glaterameracetat (Copaxone®), Azathioprin, Mitoxantron und Natalizumab. Azathioprin wirkt immunsuppressiv, Glaterameracetat immunmodulierend, Mitoxantron zytostatisch und Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der als selektiver Hemmstoff für das Adhäsionsmolekül $\alpha 4$ Integrin wirkt, das sich an der Oberfläche von weißen Blutkörperchen befinden. IFN- β gehört zu der Gruppe der Typ II Interferone und wirkt immunmodulierend. IFN- β wird die Hemmung bestimmter Zytokine, Metalloproteinasen und Adhäsionsmolekülen zugesprochen, die zu einer Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke führt, um somit ein weiteres Einwandern von autoreaktiven T-Zellen verhindert (Calabresi et al., 1997b; Furlan et al., 2000; Zang et al., 2001). Außerdem wird die Expression von Klasse-II-MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen unterdrückt und führt zu einer Herabsetzung der T-Zell-Resistenz gegenüber Apoptose (Sharief et al., 2001).

Obwohl einige Effekte von IFN- β durch *in vitro* und *in vivo* Studien bereits erforscht wurden, werden stetig weitere Studien durchgeführt, um den genauen Wirkmechanismus von IFN- β aufzuklären. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch nicht bekannt, ob eine IFN- β Therapie die Proliferation und Differenzierung der Oligodendrozyten beeinflusst.

In vitro Studien, bei denen Oligodendrozyten in gemischten Gliazellkulturen mit rekombinantem IFN- β behandelt wurden haben gezeigt, dass IFN- β die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen inhibiert. In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung von IFN- β an isolierten Oligodendrozytenvorläuferzellen untersucht. Dabei konnte kein Effekt auf die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen aufgezeigt werden, was vermuten lässt, dass die Inhibierung der Differenzierung durch einen indirekten Effekt über

andere Gliazellen vermittelt wird. Es konnte kein Einfluss von rekombinantem IFN- β auf die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen verzeichnet werden (Heine et al., 2006).

Für die vorliegende Arbeit wurde im Vergleich zu den direkten IFN- β -Stimulationsexperimenten ein Zellkulturmodell gewählt, das den physiologischen Bedingungen nahe kommt. Dabei wurde mit einem Zellkultursystem gearbeitet, dessen Primärzellen aus dem Gehirn neugeborener Ratten gewonnen wurden (Heine et al., 2006; Stangel and Bernard, 2003). Auch vorangegangene Arbeiten nutzten ein ähnliches Zellkultursystem, mit dem Unterschied, dass die Primärzellen dem Gehirn 15-16 Tage alter Rattenembryonen entstammten (Ferraro et al., 1987; Savettieri et al., 1984). Die Oligodendrozyten wurden nicht isoliert kultiviert sondern mit Astrozyten und Mikroglia kulturell kultiviert, um den zytotoxischen Effekt des humanen Serums auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen zu reduzieren (Ruijs et al., 1990). Die optimale Serumkonzentration, bei der die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen im Vergleich zum Kontrollmedium nicht beeinflusst wurde, lag bei 10%. Durch die Kulturell Kultivierung der Oligodendrozyten mit Astrozyten und Mikroglia konnte ein eventueller indirekter Effekt berücksichtigt werden.

Bei diesem Versuch wurde auf rekombinantes IFN- β für die Stimulation der Zellen verzichtet, da systemisch verabreichtes IFN- β , wie es bei der MS-Therapie der Fall ist, keine hohen Konzentrationen im ZNS erreicht. Rekombinantes IFN- β kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Das bedeutet, dass die primären Effekte im systemischen Immunsystem und/oder an der Blut-Hirn-Schranke zu erwarten sind. IFN- β kann Veränderungen in den biologischen Fähigkeiten der Lymphozyten induzieren. Wenn eine solche Zelle oder ihre Produkte in das ZNS eindringen, haben sie das Potenzial Effekte auf neuronale Zellen und Gliazellen zu vermitteln, was von Zellen unbehandelter MS-Patienten nicht zu erwarten wäre (Antel und Miron, 2008). Aus diesem Grund wurde Serum von unbehandelten und IFN- β behandelten MS-Patienten eingesetzt, um den möglichen indirekten Einfluss einer IFN- β Therapie auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen zu untersuchen. Die veränderte Konzentration der Faktoren im Serum könnte einen Einfluss auf die Gliazellen haben und so einen Effekt auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen bewirken. Der Einfluss auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen ist in der MS sehr wichtig, da die Remyelinisierung Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration darstellt.

Die vorliegende Arbeit zeigt beim Vergleich von Serum unbehandelter MS-Patienten und gesunder Kontrollen eine Hemmung der Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen.

Serumfaktoren, die im MS-Serum präsent sind scheinen das Wachstum der Gliazellen zu inhibieren. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in gemischten Gliazellkulturen beobachtet. Dabei wurde jedoch die Proliferation der gesamten Gliazellen und nicht spezifisch die der Oligodendrozytenvorläuferzellen gemessen. Ferraro et al. postulieren, dass MS-Seren im Vergleich zu Seren von gesunden Kontrollen die Proliferation von Gliazellen inhibieren und zwar unabhängig von Stadium der Krankheit (Ferraro et al., 1987; Savettieri et al., 1984). Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit erweitern die Beobachtung, indem aufgezeigt werden konnte, dass die Inhibierung zumindest teilweise die Oligodendrozytenvorläuferzellen betrifft. In einem weiteren Versuchsansatz konnte der inhibierende Effekt des MS-Serums auf die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen durch IFN- β -Behandlung fast vollständig aufgehoben werden.

Seren eines zweiten Patientenkollektivs wurden vor Beginn und 6 bzw. 12 Monate nach Initiation der IFN- β Therapie gesammelt. Die Inkubation der gemischten Gliazellen mit diesen Seren führte zu dem Ergebnis, dass die Umkehrung des inhibierenden Effekts nach einer Dauer von mindestens 12 Monaten, nicht jedoch nach 6 Monaten einer IFN- β Therapie erfolgte. Im Gegensatz dazu konnte lediglich ein geringer, jedoch nicht signifikanter Effekt der MS-Seren auf die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen beobachtet werden. Es ist nicht unklar, über welchen Mechanismus die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen nach Inkubation mit Serum IFN- β behandelter MS-Patienten erhöht ist. Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem klinischem Erfolg von IFN- β und der erhöhten Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen gefunden wenn EDSS und Schubrate nach 6 und mind. 12 Monaten nach IFN- β Behandlung verglichen wurden.

Einige klinische Studien zeigten, dass sich der Krankheitsverlauf der MS vor allem in den ersten 6 Monaten der IFN- β Behandlung nur ungenügend verbesserte. Die molekularen Faktoren, die für diesen hinausgezögerten Effekt verantwortlich sind, sind nicht bekannt. Sie zeigen jedoch, dass das IFN- β regelmäßig für mehrere Monate verabreicht werden muss, damit sich die volle Wirkung dieses Medikaments entfalten kann. Gleichermaßen werden die Faktoren, die die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen in unserem Versuch beeinflussen, nicht sofort freigesetzt, sondern benötigen eine Behandlungsdauer von mind. 12 Monaten.

Heine et al. (2006) postulieren, dass die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen zu myelinbildenden Oligodendrozyten inhibiert ist, wenn diese zusammen mit Astrozyten und Mikroglia kultiviert und mit rekombinantem IFN- β behandelt werden. Eine Veränderung der

Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen wurde nicht beobachtet. Anders als die Ergebnisse von Heine et al. (2006), zeigt der vorliegende Versuch eine erhöhte Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen auf, die durch die Inkubation mit Serum von IFN- β behandelten MS-Patienten im Vergleich zu dem Serum unbehandelter MS-Patienten hervorgerufen wurde. Das lässt vermuten, dass dieser Effekt nicht direkt auf das IFN- β zurückzuführen ist, sondern eher auf eine Veränderung von Faktoren, die wiederum die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen beeinflussen. Einer dieser möglichen Faktoren könnte der Nerve Growth Factor (NGF) sein, der mit dem neurotrophen Tyrosin Kinase Rezeptor A (trkA) interagiert und welcher u.a. auf sich entwickelnde Oligodendrozyten exprimiert wird. Biernacki et al. (2005) zeigt, dass humane endotheliale Zellen NGF produzieren, nachdem sie IFN- β behandelten mononukleären Zellen *in vitro* oder mononukleären Zellen von IFN- β behandelten MS-Patienten ausgesetzt werden (Biernacki et al., 2005). *In vitro* Studien demonstrieren, dass NGF das Überleben von differenzierten Oligodendrozyten unterstützt. Bei der simultanen Verabreichung von NGF und Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 kommt es zu einer Erhöhung der FGF-2 vermittelten Proliferation der O2A-Vorläuferzellen (Cohen et al., 1996). Auch in Astrozyten *in vitro* kann ein Effekt durch die Inkubation mit rekombinantem IFN- β verzeichnet werden, indem eine signifikante Erhöhung der NGF-Expression induziert wird (Boutros et al., 1997).

Indirekte Effekte einer IFN- β -Therapie konnten durch periphere mononukleäre Blutzellen von MS-Patienten mit schubförmiger MS bestätigt werden. Sie produzierten Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) nach einer IFN- β -Therapie (Caggiula et al., 2006). Es ist bereits gezeigt worden, dass BDNF die Proliferation, Entwicklung, Differenzierung und Myelinisierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen positiv beeinflusst (de Groot et al., 2006; Du et al., 2006; Du et al., 2003; McTigue et al., 1998; Van't Veer et al., 2009). Zytokine wie das Interleukin-6 (IL-6), die dafür bekannt sind das Überleben der Oligodendrozytenvorläuferzellen zu unterstützen (Barres et al., 1993), erreichen höhere Serumkonzentrationen nach einer IFN- β -Behandlung (Nakatsuji et al., 2006). Die Sekretion solcher trophischer Faktoren und Zytokine an der Blut-Hirn-Schranke und durch mononukleäre Zellen könnte einen indirekten Effekt von IFN- β auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen und die Remyelinisierung repräsentieren.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Dissertation, dass Serum von MS-Patienten die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen inhibiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine IFN- β -Behandlung von mindestens 12 Monaten dem inhibierenden Effekt

des MS-Serums fast vollständig entgegenwirken kann. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich eine IFN- β -Behandlung positiv auf die Proliferation der Oligodendrozytenvorläuferzellen und auf deren Überleben auswirkt.

- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. 1996. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 47, 889-894.
- Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Jr., Walsh, J.E., 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170, 211-224.
- Alix, J.J., Fern, R., 2009. Glutamate receptor-mediated ischemic injury of premyelinated central axons. *Ann Neurol* 66, 682-693.
- Antel, J.P., Miron, V.E., 2008. Central nervous system effects of current and emerging multiple sclerosis-directed immuno-therapies. *Clin Neurol Neurosurg* 110, 951-957.
- Arnett, H.A., Fancy, S.P., Alberta, J.A., Zhao, C., Plant, S.R., Kaing, S., Raine, C.S., Rowitch, D.H., Franklin, R.J., Stiles, C.D., 2004. bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science* 306, 2111-2115.
- Barres, B.A., 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430-440.
- Barres, B.A., Schmid, R., Sendtner, M., Raff, M.C., 1993. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118, 283-295.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051-1057.
- Biernacki, K., Antel, J.P., Blain, M., Narayanan, S., Arnold, D.L., Prat, A., 2005. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62, 563-568.
- Bizzozero, O.A., DeJesus, G., Callahan, K., Pastuszyn, A., 2005. Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81, 687-695.
- Blakemore, W.F., 1972. Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol* 1, 413-426.
- Blakemore, W.F., 1973. Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. *J Neurol Sci* 20, 63-72.
- Booss, J., Esiri, M.M., Tourtellotte, W.W., Mason, D.Y., 1983. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 62, 219-232.
- Boutros, T., Croze, E., Yong, V.W., 1997. Interferon-beta is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. *J Neurochem* 69, 939-946.

- Bradl, M., Lassmann, H., 2009. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*
- Brand-Schieber, E., Werner, P., 2003a. (+/-)-Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid and kainate receptor subunit expression in mouse versus rat spinal cord white matter: similarities in astrocytes but differences in oligodendrocytes. *Neurosci Lett* 345, 126-130.
- Brand-Schieber, E., Werner, P., 2003b. AMPA/kainate receptors in mouse spinal cord cell-specific display of receptor subunits by oligodendrocytes and astrocytes and at the nodes of Ranvier. *Glia* 42, 12-24.
- Butt, A.M., Ibrahim, M., Ruge, F.M., Berry, M., 1995. Biochemical subtypes of oligodendrocyte in the anterior medullary velum of the rat as revealed by the monoclonal antibody Rip. *Glia* 14, 185-197.
- Caggiula, M., Batocchi, A.P., Frisullo, G., Angelucci, F., Patanella, A.K., Sancricca, C., Nociti, V., Tonali, P.A., Mirabella, M., 2006. Neurotrophic factors in relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients during interferon beta therapy. *Clin Immunol* 118, 77-82.
- Cai, J., Qi, Y., Hu, X., Tan, M., Liu, Z., Zhang, J., Li, Q., Sander, M., Qiu, M., 2005. Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* 45, 41-53.
- Calabrese, V., Raffaele, R., Cosentino, E., Rizza, V., 1994. Changes in cerebrospinal fluid levels of malondialdehyde and glutathione reductase activity in multiple sclerosis. *Int J Clin Pharmacol Res* 14, 119-123.
- Calabresi, P.A., Pelfrey, C.M., Tranquill, L.R., Maloni, H., McFarland, H.F., 1997a. VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* 49, 1111-1116.
- Calabresi, P.A., Tranquill, L.R., Dambrosia, J.M., Stone, L.A., Maloni, H., Bash, C.N., Frank, J.A., McFarland, H.F., 1997b. Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Ann Neurol* 41, 669-674.
- Carlson, N.G., Rose, J.W., 2006. Antioxidants in multiple sclerosis: do they have a role in therapy? *CNS Drugs* 20, 433-441.
- Cohen, R.I., Marmor, R., Norton, W.T., Mehler, M.F., Kessler, J.A., 1996. Nerve growth factor and neurotrophin-3 differentially regulate the proliferation and survival of developing rat brain oligodendrocytes. *J Neurosci* 16, 6433-6442.
- Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517.
- Confavreux, C., Vukusic, S., 2006. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 129, 595-605.

- Cuzner, M.L., Opdenakker, G., 1999. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 94, 1-14.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- de Groot, D.M., Coenen, A.J., Verhofstad, A., van Herp, F., Martens, G.J., 2006. In vivo induction of glial cell proliferation and axonal outgrowth and myelination by brain-derived neurotrophic factor. *Mol Endocrinol* 20, 2987-2998.
- Deng, W., Wang, H., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., Jensen, F.E., 2004. Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7751-7756.
- Diemel, L.T., Copelman, C.A., Cuzner, M.L., 1998. Macrophages in CNS remyelination: friend or foe? *Neurochem Res* 23, 341-347.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
- Domercq, M., Sanchez-Gomez, M.V., Sherwin, C., Etxebarria, E., Fern, R., Matute, C., 2007. System xc- and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *J Immunol* 178, 6549-6556.
- Dougherty, K.D., Dreyfus, C.F., Black, I.B., 2000. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 7, 574-585.
- Du, Y., Dreyfus, C.F., 2002. Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res* 68, 647-654.
- Du, Y., Fischer, T.Z., Clinton-Luke, P., Lercher, L.D., Dreyfus, C.F., 2006. Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 31, 366-375.
- Du, Y., Fischer, T.Z., Lee, L.N., Lercher, L.D., Dreyfus, C.F., 2003. Regionally specific effects of BDNF on oligodendrocytes. *Dev Neurosci* 25, 116-126.
- Dubois-Dalcq, M., Behar, T., Hudson, L., Lazzarini, R.A., 1986. Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102, 384-392.
- Dupree, J.L., Girault, J.A., Popko, B., 1999. Axo-glial interactions regulate the localization of axonal paranodal proteins. *J Cell Biol* 147, 1145-1152.

- Edgar, J.M., McLaughlin, M., Yool, D., Zhang, S.C., Fowler, J.H., Montague, P., Barrie, J.A., McCulloch, M.C., Duncan, I.D., Garbern, J., Nave, K.A., Griffiths, I.R., 2004. Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 166, 121-131.
- Ferguson, B., Matyszak, M.K., Esiri, M.M., Perry, V.H., 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3), 393-399.
- Ferraro, D., Salemi, G., Cestelli, A., Chiarini, A., Savettieri, G., 1987. Inhibition of glial proliferation in vitro by serum from patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 76, 237-240.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Principi, F., Di Ludovico, F., Viti, B., Angeleri, V.A., Danni, M., Provinciali, L., 2005. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Mult Scler* 11, 677-682.
- Fogarty, M., Richardson, W.D., Kessaris, N., 2005. A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* 132, 1951-1959.
- Follett, P.L., Deng, W., Dai, W., Talos, D.M., Massillon, L.J., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., Jensen, F.E., 2004. Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate. *J Neurosci* 24, 4412-4420.
- Franklin, R.J., Ffrench-Constant, C., 2008. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9, 839-855.
- Frost, E., Kiernan, B.W., Faissner, A., Ffrench-Constant, C., 1996. Regulation of oligodendrocyte precursor migration by extracellular matrix: evidence for substrate-specific inhibition of migration by tenascin-C. *Dev Neurosci* 18, 266-273.
- Fu, X.Y., Schindler, C., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr., 1992. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7840-7843.
- Fugger, L., Friese, M.A., Bell, J.I., 2009. From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 9, 408-417.
- Furlan, R., Bergami, A., Lang, R., Brambilla, E., Franciotta, D., Martinelli, V., Comi, G., Panina, P., Martino, G., 2000. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. *J Neuroimmunol* 111, 86-92.
- Gallo, V., Armstrong, R.C., 1995. Developmental and growth factor-induced regulation of nestin in oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci* 15, 394-406.
- Gao, F.B., Apperly, J., Raff, M., 1998. Cell-intrinsic timers and thyroid hormone regulate the probability of cell-cycle withdrawal and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Dev Biol* 197, 54-66.

- Garbern, J.Y., Yool, D.A., Moore, G.J., Wilds, I.B., Faulk, M.W., Klugmann, M., Nave, K.A., Siermans, E.A., van der Knaap, M.S., Bird, T.D., Shy, M.E., Kamholz, J.A., Griffiths, I.R., 2002. Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 125, 551-561.
- Gard, A.L., Pfeiffer, S.E., 1993. Glial cell mitogens bFGF and PDGF differentially regulate development of O4+GalC- oligodendrocyte progenitors. *Dev Biol* 159, 618-630.
- Gilden, D.H., 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4, 195-202.
- Glezer, I., Lapointe, A., Rivest, S., 2006. Innate immunity triggers oligodendrocyte progenitor reactivity and confines damages to brain injuries. *Faseb J* 20, 750-752.
- Gold, R., Riekmann, P., 2004. Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose. UNI-MED Verlag AG Bremen 3. Auflage.
- Greco, A., Minghetti, L., Sette, G., Fieschi, C., Levi, G., 1999. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 53, 1876-1879.
- Greiner, J.W., Guadagni, F., Noguchi, P., Pestka, S., Colcher, D., Fisher, P.B., Schlom, J., 1987. Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions in vivo. *Science* 235, 895-898.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M.H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N., Nave, K.A., 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280, 1610-1613.
- Gritti, A., Parati, E.A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D., Vescovi, A.L., 1996. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16, 1091-1100.
- Hardy, R., Reynolds, R., 1993. Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. *J Neurosci Res* 36, 121-126.
- Hart, I.K., Richardson, W.D., Bolsover, S.R., Raff, M.C., 1989. PDGF and intracellular signaling in the timing of oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biol* 109, 3411-3417.
- Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C., Weiner, H.L., 1986. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 19, 578-587.
- Heine, S., Ebnet, J., Maysami, S., Stangel, M., 2006. Effects of interferon-beta on oligodendroglial cells. *J Neuroimmunol* 177, 173-180.
- Hemmer, B., Archelos, J.J., Hartung, H.P., 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3, 291-301.

- Henderson, A.P., Barnett, M.H., Parratt, J.D., Prineas, J.W., 2009. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 66, 739-753.
- Hernan, M.A., Jick, S.S., Logroscino, G., Olek, M.J., Ascherio, A., Jick, H., 2005. Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain* 128, 1461-1465.
- Horiuchi, M., Itoh, A., Pleasure, D., Itoh, T., 2006. MEK-ERK signaling is involved in interferon-gamma-induced death of oligodendroglial progenitor cells. *J Biol Chem* 281, 20095-20106.
- Hughes, L.E., Smith, P.A., Bonell, S., Natt, R.S., Wilson, C., Rashid, T., Amor, S., Thompson, E.J., Croker, J., Ebringer, A., 2003. Cross-reactivity between related sequences found in *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144, 105-115.
- Hunter, S.F., Bottenstein, J.E., 1990. Growth factor responses of enriched bipotential glial progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* 54, 235-248.
- Hunter, S.F., Bottenstein, J.E., 1991. O-2A glial progenitors from mature brain respond to CNS neuronal cell line-derived growth factors. *J Neurosci Res* 28, 574-582.
- Jurewicz, A., Matysiak, M., Tybor, K., Kilianek, L., Raine, C.S., Selmaj, K., 2005. Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain* 128, 2675-2688.
- Juurlink, B.H., 1997. Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 151-166.
- Kaplan, M.R., Cho, M.H., Ullian, E.M., Isom, L.L., Levinson, S.R., Barres, B.A., 2001. Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron* 30, 105-119.
- Kaplan, M.R., Meyer-Franke, A., Lambert, S., Bennett, V., Duncan, I.D., Levinson, S.R., Barres, B.A., 1997. Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* 386, 724-728.
- Kaplan, M.S., Hinds, J.W., 1980. Gliogenesis of astrocytes and oligodendrocytes in the neocortical grey and white matter of the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *J Comp Neurol* 193, 711-727.
- Kappos, L., Clanet, M., Sandberg-Wollheim, M., Radue, E.W., Hartung, H.P., Hohlfeld, R., Xu, J., Bennett, D., Sandrock, A., Goelz, S., 2005. Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-year controlled study. *Neurology* 65, 40-47.
- Karg, E., Klivenyi, P., Nemeth, I., Bencsik, K., Pinter, S., Vecsei, L., 1999. Nonenzymatic antioxidants of blood in multiple sclerosis. *J Neurol* 246, 533-539.

- Kassmann, C.M., Lappe-Siefke, C., Baes, M., Brugger, B., Mildner, A., Werner, H.B., Natt, O., Michaelis, T., Prinz, M., Frahm, J., Nave, K.A., 2007. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet* 39, 969-976.
- Kassmann, C.M., Nave, K.A., 2008. Oligodendroglial impact on axonal function and survival - a hypothesis. *Curr Opin Neurol* 21, 235-241.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., Prat, A., 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13, 1173-1175.
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., Richardson, W.D., 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9, 173-179.
- Kirkpatrick, L.L., Witt, A.S., Payne, H.R., Shine, H.D., Brady, S.T., 2001. Changes in microtubule stability and density in myelin-deficient shiverer mouse CNS axons. *J Neurosci* 21, 2288-2297.
- Koch, M., Ramsaransing, G.S., Arutjunyan, A.V., Stepanov, M., Teelken, A., Heersema, D.J., De Keyser, J., 2006. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J Neurol* 253, 483-487.
- Kotter, M.R., Setzu, A., Sim, F.J., Van Rooijen, N., Franklin, R.J., 2001. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia* 35, 204-212.
- Krause, C.D., Mei, E., Mirochnitchenko, O., Lavnikova, N., Xie, J., Jia, Y., Hochstrasser, R.M., Pestka, S., 2006. Interactions among the components of the interleukin-10 receptor complex. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 377-385.
- Kreth, H.W., Dunker, R., Rodt, H., Meyermann, R., 1982. Immunohistochemical identification of T-lymphocytes in the central nervous system of patients with multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis. *J Neuroimmunol* 2, 177-183.
- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Bruck, W., 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R., Nave, K.A., 2003. Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33, 366-374.
- Lassmann, H., 1983. Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Schriftenr Neurol* 25, 1-135.

- Leipe, J., Skapenko, A., Schulze-Koops, H., 2009. [Th17 cells - a new proinflammatory T cell population and its role in rheumatologic autoimmune diseases]. *Z Rheumatol* 68, 405-408.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D., 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Leppert, D., Waubant, E., Burk, M.R., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 1996. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40, 846-852.
- Levison, S.W., Goldman, J.E., 1993. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10, 201-212.
- Li, S., Stys, P.K., 2000. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J Neurosci* 20, 1190-1198.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330, 613-622.
- Lu, Q.R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C.D., Rowitch, D.H., 2002. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109, 75-86.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717.
- Lunemann, J.D., Aktas, O., Gniadek, P., Zschenderlein, R., Zipp, F., 2001. Downregulation of transforming growth factor-beta1 in interferon-beta1a-treated MS patients. *Neurology* 57, 1132-1134.
- Manning, S.M., Talos, D.M., Zhou, C., Selip, D.B., Park, H.K., Park, C.J., Volpe, J.J., Jensen, F.E., 2008. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. *J Neurosci* 28, 6670-6678.
- Mark, D.F., Lu, S.D., Creasey, A.A., Yamamoto, R., Lin, L.S., 1984. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5662-5666.
- Marrie, R.A., 2004. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 3, 709-718.
- Mathey, E.K., Derfuss, T., Storch, M.K., Williams, K.R., Hales, K., Woolley, D.R., Al-Hayani, A., Davies, S.N., Rasband, M.N., Olsson, T., Moldenhauer, A., Velhin, S., Hohlfeld, R., Meinl, E., Linington, C., 2007. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 204, 2363-2372.
- Matute, C., Sanchez-Gomez, M.V., Martinez-Millan, L., Miledi, R., 1997. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8830-8835.

- McCarthy, G.F., Leblond, C.P., 1988. Radioautographic evidence for slow astrocyte turnover and modest oligodendrocyte production in the corpus callosum of adult mice infused with 3H-thymidine. *J Comp Neurol* 271, 589-603.
- McCarthy, K.D., de Vellis, J., 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85, 890-902.
- McDonald, J.W., Althomsons, S.P., Hyrc, K.L., Choi, D.W., Goldberg, M.P., 1998. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 4, 291-297.
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127.
- McTigue, D.M., Horner, P.J., Stokes, B.T., Gage, F.H., 1998. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci* 18, 5354-5365.
- Merrill, J.E., Scolding, N.J., 1999. Mechanisms of damage to myelin and oligodendrocytes and their relevance to disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 435-458.
- Mikaeloff, Y., Caridade, G., Tardieu, M., Suissa, S., 2007. Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. *Brain* 130, 2589-2595.
- Milner, R., Anderson, H.J., Rippon, R.F., McKay, J.S., Franklin, R.J., Marchionni, M.A., Reynolds, R., French-Constant, C., 1997. Contrasting effects of mitogenic growth factors on oligodendrocyte precursor cell migration. *Glia* 19, 85-90.
- Milo, R., Kahana, E., 2009. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*.
- Monge, M., Kadiiski, D., Jacque, C.M., Zalc, B., 1986. Oligodendroglial expression and deposition of four major myelin constituents in the myelin sheath during development. An in vivo study. *Dev Neurosci* 8, 222-235.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., van der Kooy, D., 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071-1082.
- Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., Van Evercooren, A.B., 1999. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11, 4357-4366.

- Nakatsuji, Y., Nakano, M., Moriya, M., Kishigami, H., Tatsumi, C., Tada, S., Sadahiro, S., Naka, T., Mitani, K., Funauchi, M., Azuma, T., Watanabe, S., Kinoshita, M., Kajiyama, K., Yuasa, Y., Kaido, M., Takahashi, M.P., Naba, I., Hazama, T., Sakoda, S., 2006. Beneficial effect of interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis is associated with transient increase in serum IL-6 level in response to interferon-beta injection. *Cytokine* 36, 69-74.
- Newcombe, J., Uddin, A., Dove, R., Patel, B., Turski, L., Nishizawa, Y., Smith, T., 2008. Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 18, 52-61.
- Niculescu, T., Weerth, S., Niculescu, F., Cudrici, C., Rus, V., Raine, C.S., Shin, M.L., Rus, H., 2004. Effects of complement C5 on apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 172, 5702-5706.
- Nociari, M.M., Shaley, A., Benias, P., Russo, C., 1998. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 213, 157-167.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952.
- Nyland, H., Mork, S., Matre, R., 1982. In-situ characterization of mononuclear cell infiltrates in lesions of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 8, 403-411.
- Olivier, C., Cobos, I., Perez Villegas, E.M., Spassky, N., Zalc, B., Martinez, S., Thomas, J.L., 2001. Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* 128, 1757-1769.
- Opdenakker, G., Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., Van Damme, J., 2001. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 69, 851-859.
- Orentas, D.M., Miller, R.H., 1996. The origin of spinal cord oligodendrocytes is dependent on local influences from the notochord. *Dev Biol* 177, 43-53.
- Ortaldo, J.R., Mason, A., Rehberg, E., Moschera, J., Kelder, B., Pestka, S., Herberman, R.B., 1983. Effects of recombinant and hybrid recombinant human leukocyte interferons on cytotoxic activity of natural killer cells. *J Biol Chem* 258, 15011-15015.
- Ousman, S.S., Tomooka, B.H., van Noort, J.M., Wawrousek, E.F., O'Connor, K.C., Hafler, D.A., Sobel, R.A., Robinson, W.H., Steinman, L., 2007. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 448, 474-479.
- Pestka, S., 2007. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 282, 20047-20051.
- Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., Samuel, C.E., 1987. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56, 727-777.
- Pfeiffer, S.E., Warrington, A.E., Bansal, R., 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3, 191-197.

- Picard-Riera, N., Decker, L., Delarasse, C., Goude, K., Nait-Oumesmar, B., Liblau, R., Pham-Dinh, D., Evercooren, A.B., 2002. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13211-13216.
- Platten, M., Steinman, L., 2005. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat Med* 11, 252-253.
- Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., Furlan, R., Comi, G., Vescovi, A.L., Martino, G., 2003. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 422, 688-694.
- Polman, C., Kappos, L., White, R., Dahlke, F., Beckmann, K., Pozzilli, C., Thompson, A., Petkau, J., Miller, D., 2003. Neutralizing antibodies during treatment of secondary progressive MS with interferon beta-1b. *Neurology* 60, 37-43.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58, 840-846.
- Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W.A., Silberberg, D.H., Tourtellotte, W.W., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13, 227-231.
- Poser, S., Wikstrom, J., Bauer, H.J., 1979. Clinical data and the identification of special forms of multiple sclerosis in 1271 cases studied with a standardized documentation system. *J Neurol Sci* 40, 159-168.
- Prat, A., Antel, J., 2005. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 18, 225-230.
- Prineas, J.W., Connell, F., 1979. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5, 22-31.
- Prineas, J.W., Kwon, E.E., Goldenberg, P.Z., Ilyas, A.A., Quarles, R.H., Benjamins, J.A., Sprinkle, T.J., 1989. Multiple sclerosis. Oligodendrocyte proliferation and differentiation in fresh lesions. *Lab Invest* 61, 489-503.
- Pringle, N.P., Richardson, W.D., 1993. A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* 117, 525-533.
- Raff, M.C., Lillien, L.E., Richardson, W.D., Burne, J.F., Noble, M.D., 1988. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 333, 562-565.
- Raine, C.S., Scheinberg, L., Waltz, J.M., 1981. Multiple sclerosis. Oligodendrocyte survival and proliferation in an active established lesion. *Lab Invest* 45, 534-546.

- Reynolds, R., Wilkin, G.P., 1988. Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development* 102, 409-425.
- Rhodes, K.E., Raivich, G., Fawcett, J.W., 2006. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience* 140, 87-100.
- Richardson, P.M., McGuinness, U.M., Aguayo, A.J., 1980. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284, 264-265.
- Richardson, W.D., Pringle, N., Mosley, M.J., Westermarck, B., Dubois-Dalcq, M., 1988. A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 53, 309-319.
- Rose, A.S., Ellison, G.W., Myers, L.W., Tourtellotte, W.W., 1976. Criteria for the clinical diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology* 26, 20-22.
- Rudick, R.A., Ransohoff, R.M., Lee, J.C., Pepler, R., Yu, M., Mathisen, P.M., Tuohy, V.K., 1998. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 50, 1294-1300.
- Ruijs, T.C., Olivier, A., Antel, J.P., 1990. Serum cytotoxicity to human and rat oligodendrocytes in culture. *Brain Res* 517, 99-104.
- Rus, H., Cudrici, C., Niculescu, F., 2005. C5b-9 complement complex in autoimmune demyelination and multiple sclerosis: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *Ann Med* 37, 97-104.
- Sadovnick, A.D., Remick, R.A., Allen, J., Swartz, E., Yee, I.M., Eisen, K., Farquhar, R., Hashimoto, S.A., Hooge, J., Kastrukoff, L.F., Morrison, W., Nelson, J., Oger, J., Paty, D.W., 1996. Depression and multiple sclerosis. *Neurology* 46, 628-632.
- Sadovnick, A.D., Yee, I.M., Ebers, G.C., 2000. Factors influencing sib risks for multiple sclerosis. *Clin Genet* 58, 431-435.
- Sanchez-Gomez, M.V., Matute, C., 1999. AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiol Dis* 6, 475-485.
- Savettieri, G., Ferraro, D., Chiarini, A., Cestelli, A., 1984. Rat CNS cell culture. Enhancement of neuronal survival and delay of glial proliferation by serum from patients with multiple sclerosis. A morphological study. *Ital J Neurol Sci* 5, 311-316.
- Sayre, L.M., Perry, G., Smith, M.A., 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21, 172-188.
- Schneider, G.H., Baethmann, A., Kempfski, O., 1992. Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl, S334-343.

- Schumacker, G.A., Beebe, G., Kibler, R.F., Kurland, L.T., Kurtzke, J.F., McDowell, F., Nagler, B., Sibley, W.A., Tourtellotte, W.W., Willmon, T.L., 1965. Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122, 552-568.
- Sen, G.C., Lengyel, P., 1992. The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem* 267, 5017-5020.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., Aloisi, F., 2007. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204, 2899-2912.
- Sharief, M.K., Semra, Y.K., 2001. Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 119, 350-357.
- Sharief, M.K., Semra, Y.K., Seidi, O.A., Zoukos, Y., 2001. Interferon-beta therapy downregulates the anti-apoptosis protein FLIP in T cells from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 120, 199-207.
- Shukla, V.K., Jensen, G.E., Clausen, J., 1977. Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 56, 542-550.
- Small, R.K., Riddle, P., Noble, M., 1987. Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* 328, 155-157.
- Smith, K.J., Lassmann, H., 2002. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 1, 232-241.
- Soldan, S.S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P.A., Brennan, M.B., Maloni, H.W., McFarland, H.F., Lin, H.C., Patnaik, M., Jacobson, S., 1997. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 3, 1394-1397.
- Solly, S.K., Thomas, J.L., Monge, M., Demerens, C., Lubetzki, C., Gardinier, M.V., Matthieu, J.M., Zalc, B., 1996. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* 18, 39-48.
- Sommer, I., Schachner, M., 1981. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83, 311-327.
- Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martinez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B., Thomas, J.L., 1998. Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci* 18, 8331-8343.
- Sprinkle, T.J., 1989. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 4, 235-301.

- Sriram, S., Mitchell, W., Stratton, C., 1998. Multiple sclerosis associated with Chlamydia pneumoniae infection of the CNS. *Neurology* 50, 571-572.
- Stangel, M., Bernard, D., 2003. Polyclonal IgM influence oligodendrocyte precursor cells in mixed glial cell cultures: implications for remyelination. *J Neuroimmunol* 138, 25-30.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D., 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-264.
- Steinman, L., Martin, R., Bernard, C., Conlon, P., Oksenberg, J.R., 2002. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 25, 491-505.
- Stidworthy, M.F., Genoud, S., Li, W.W., Leone, D.P., Mantei, N., Suter, U., Franklin, R.J., 2004. Notch1 and Jagged1 are expressed after CNS demyelination, but are not a major rate-determining factor during remyelination. *Brain* 127, 1928-1941.
- Stuve, O., Dooley, N.P., Uhm, J.H., Antel, J.P., Francis, G.S., Williams, G., Yong, V.W., 1996. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 40, 853-863.
- Sun, T., Pringle, N.P., Hardy, A.P., Richardson, W.D., Smith, H.K., 1998. Pax6 influences the time and site of origin of glial precursors in the ventral neural tube. *Mol Cell Neurosci* 12, 228-239.
- Suzuki, K., Andrews, J.M., Waltz, J.M., Terry, R.D., 1969. Ultrastructural studies of multiple sclerosis. *Lab Invest* 20, 444-454.
- Syburra, C., Passi, S., 1999. Oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Ukr Biokhim Zh* 71, 112-115.
- Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Yoshida, S., Chisaka, O., Ikenaka, K., Nabeshima, Y., 2002. The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* 12, 1157-1163.
- Thorburne, S.K., Juurlink, B.H., 1996. Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *J Neurochem* 67, 1014-1022.
- Timsit, S., Martinez, S., Allinquant, B., Peyron, F., Puelles, L., Zalc, B., 1995. Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* 15, 1012-1024.
- Trapp, B.D., Nave, K.A., 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 31, 247-269.
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338, 278-285.
- Trapp, B.D., Ransohoff, R., Rudick, R., 1999. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 12, 295-302.

- Traugott, U., Reinherz, E.L., Raine, C.S., 1983. Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science* 219, 308-310.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., Fugger, L., 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172, 146-155.
- Uschkureit, T., Sporkel, O., Stracke, J., Bussow, H., Stoffel, W., 2000. Early onset of axonal degeneration in double (plp^{-/-}mag^{-/-}) and hypomyelinoses in triple (plp^{-/-}mbp^{-/-}mag^{-/-}) mutant mice. *J Neurosci* 20, 5225-5233.
- Vallstedt, A., Klos, J.M., Ericson, J., 2005. Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* 45, 55-67.
- Van't Veer, A., Du, Y., Fischer, T.Z., Boetig, D.R., Wood, M.R., Dreyfus, C.F., 2009. Brain-derived neurotrophic factor effects on oligodendrocyte progenitors of the basal forebrain are mediated through trkB and the MAP kinase pathway. *J Neurosci Res* 87, 69-78.
- Vartanian, T.K., 2008. MS as a neurodegenerative disease (a thought experiment): the clinical evidence. *Adv Stud Med* 8, 305-308.
- Vogel, U.S., Thompson, R.J., 1988. Molecular structure, localization, and possible functions of the myelin-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *J Neurochem* 50, 1667-1677.
- Warf, B.C., Fok-Seang, J., Miller, R.H., 1991. Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J Neurosci* 11, 2477-2488.
- Waxsman, S.G., 2005. Multiple sclerosis as a neuronal disease. Boston: Elsevier Academic Press.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., Reynolds, B.A., 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16, 7599-7609.
- Wilkins, A., Majed, H., Layfield, R., Compston, A., Chandran, S., 2003. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23, 4967-4974.
- Wolswijk, G., 2000. Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. *Brain* 123 (Pt 1), 105-115.
- Woodruff, R.H., Tekki-Kessarlis, N., Stiles, C.D., Rowitch, D.H., Richardson, W.D., 2001. Oligodendrocyte development in the spinal cord and telencephalon: common themes and new perspectives. *Int J Dev Neurosci* 19, 379-385.
- Yong, V.W., Chabot, S., Stuve, O., Williams, G., 1998. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 51, 682-689.

-
- Zajicek, J.P., Wing, M., Scolding, N.J., Compston, D.A., 1992. Interactions between oligodendrocytes and microglia. A major role for complement and tumour necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing. *Brain* 115 (Pt 6), 1611-1631.
- Zang, Y.C., Halder, J.B., Samanta, A.K., Hong, J., Rivera, V.M., Zhang, J.Z., 2001. Regulation of chemokine receptor CCR5 and production of RANTES and MIP-1alpha by interferon-beta. *J Neuroimmunol* 112, 174-180.
- Zhou, Q., Anderson, D.J., 2002. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109, 61-73.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Kotsiari
Vorname: Alexandra
Geburtsdatum: 06.12.1978
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: griechisch
Familienstand: ledig

Hochschulstudium

10/1999 – 06/2005 Studium der Biologie an der Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Diplom-Biologin

Schwerpunkte:
Genetik, Biochemie und Pharmakologie & Toxikologie

Diplomarbeit:
Untersuchungen zur Funktion des humanen *TSPY*-Genlokus an
einem transgenen Mausmodell (Institut für Humangenetik der
Medizinischen Hochschule Hannover)

Promotion

seit 05/2006 Doktorandin in der Abteilung für Neurologie der Medizinischen
Hochschule Hannover

Veröffentlichungen

Effects of fumaric acids on cuprizone induced central nervous system de- and remyelination in the mouse

Moharreggh-Khiabani D, Blank A, Skripuletz T, Miller E, **Kotsiari A**, Gudi V, Stangel M.

PLoS One. 2010 (submitted)

Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination.

Gudi V, Moharreggh-Khiabani D, Skripuletz T, Koutsoudaki PN, **Kotsiari A**, Skuljec J, Trebst C, Stangel M.

Brain Res. 2009

Analysis of Neuroprotective Effects of Valproic Acid on Primary Motor Neurons in Monoculture or Co-cultures with Astrocytes or Schwann Cells.

Ragancokova D, Jahn K, **Kotsiari A**, Schlesinger F, Haastert K, Stangel M, Petri S, Krampfl K.

Cell Mol Neurobiol. 2009

A beta-lactam antibiotic dampens excitotoxic inflammatory CNS damage in a mouse model of multiple sclerosis.

Melzer N, Meuth SG, Torres-Salazar D, Bittner S, Zozulya AL, Weidenfeller C, **Kotsiari A**, Stangel M, Fahlke C, Wiendl H.

PLoS One. 2008

Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent.

Skripuletz T, Lindner M, **Kotsiari A**, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M.

Am J Pathol. 2008

Hannover, den 04.02.2010

Alexandra Kotsiari

Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. med. Martin Stangel für die Überlassung des Themas und für die wissenschaftliche Unterstützung danken.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller möchte ich mich für die Übernahme des Referats und für die freundliche Unterstützung und kompetente Beratung bei der Durchführung der Promotion bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bernd Otto danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Andreea Trefilov, die stets auf meine Fragen eine Antwort hatte. Viele Dank für die hilfreiche Unterstützung und die anregenden Gespräche, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der gesamten Arbeitsgruppe der Neuroimmunologie, der Neurophysiologie und des Liquorlabors möchte ich herzlich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken.

Ich möchte mich herzlich bei Andreas Niesel bedanken, der zu jeder Zeit hilfreiche Unterstützung geboten hat.

Besonders möchte ich Christian danken, der meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegengebracht hat.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich jederzeit unterstützt haben. Ein großes Dankeschön auch an meine beiden Schwestern, die immer für mich da waren.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen bedanken, die ich evtl. vergessen habe zu erwähnen und die zur Vollendung meiner Promotion beigetragen haben.

