

Aus dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück  
und dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin Göttingen

---

**Hemmung der oligodendroglären Cholesterinsynthese via  
Simvastatin: Morphologische und biochemische Effekte bei  
kultivierten Schweineoligodendrozyten und bei der  
Remyelinisation von Cuprizon-behandelten Mäusen**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
im Fachbereich Biologie/Chemie  
der Universität Osnabrück

Vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Steve Klopfleisch  
Aus Bad Langensalza

Göttingen 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Jeserich
2. Gutachter: Prof. Dr. Brandt

---

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.	Problemstellung	1
2.	Neurale Zellen des Zentralnervensystems	1
3.	Oligodendrozyten (OL) und Myelin	3
3.1	Historie	3
3.2	Entwicklungsstufen von Oligodendrozyten	3
3.3	Steuerung der Entwicklung von OL	4
3.4	Myelin	5
3.4.1	Morphologie	5
3.4.2	Biochemie	5
3.4.2.1	Myelinlipide	5
3.4.2.2	Myelinproteine	6
4.	Multiple Sklerose	7
4.1	Therapeutische Ansätze zur Behandlung der MS	8
5.	Statine	9
5.1	Struktur und Einteilung der Statine	10
5.2	Pleiotrope Effekte von Statinen	11
6.	Kleine G-Proteine – GTPasen	12
6.1	Ras-Proteine	13
6.2	Rho-Proteine	14
6.2.1	Zytoskelett und Adhäsion	16
7.	Intention der Arbeit	17
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
1.	Geräte und Chemikalien	20
2.	Zellkultur	28
2.1	Lösungen und Medien	28
2.2	Präparation von Schweine-OL	30
2.3	Anlegen einer Monolayer-Zellkultur	31
2.4	Präparation von Mäuse-OL	31
2.5	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	33
2.6	Lebendzellfärbung	33
2.6.1	MTT-Assay	33
2.7	Detektion apoptotischer Zellen im Caspase-Assay	34
3.	Immunzytochemische Färbungen	34
3.1	Lösungen	34

---

3.2	MOSP- (Myelin-OL-spezifisches Protein) und MOG- (Myelin-OL-Glykoprotein) Färbung	35
3.3	GFAP- (Glial fibrillary acidic protein) Färbung	36
3.4	Aktinfärbung	36
<b>4.</b>	<b>HPLC</b>	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>37</b>
5.1	Herstellung des Zelllysats	37
5.1.1	Proteaseinhibitoren	37
5.1.2	Zellernte	38
5.1.3	Trennung Zytosol- und Membranfraktion	38
5.1.4	Detektion von GTP-gebundenem p21Ras, RhoA, Rac1 und Cdc42	39
5.1.5	Interaktion von RhoA mit RhoGDI	40
5.1.6	Interaktion von RhoG mit Elmo2 zur Bestimmung des Anteils von GTP-gekoppeltem RhoG	40
5.1.7	SDS – Zelllysate	41
5.2	Proteinbestimmung	41
5.2.1	Bradfordtest	41
5.2.2	Tüpfelprobe	42
5.2.3	DC – Protein-Assay	42
5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
5.4	Coomassie-Färbung von Proteinen	46
5.5	Western-Blot	46
<b>6.</b>	<b>MAPK-In-Gel-Kinase-Assay</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>SAPK/JNK Assay Kit</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>Rho-Kinase Assay</b>	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>Myelinextraktion</b>	<b>52</b>
<b>10.</b>	<b>Nachweis neu synthetisierter Proteine durch Einbau von L-[U-<sup>14</sup>C]-Leucin</b>	<b>54</b>
<b>11.</b>	<b>Cholesterinbestimmung</b>	<b>55</b>
<b>12.</b>	<b>Transfektion</b>	<b>56</b>
12.1	Transfektion mit RhoG-siRNA	57
12.2	Transfektion mit FPP	57
<b>13.</b>	<b>In vivo Untersuchungen</b>	<b>57</b>
13.1	Versuchstiere und Versuchsablauf	57
13.1.1	Versuchsreihe 1	58
13.1.2	Versuchsreihe 2	60
13.2	Präparation der Tiere	60

13.2.1	Perfusion zur Gewebefixation	60
13.2.2	Präparation von Hirngewebe für die Biochemie	61
13.3	Aufarbeitung des Hirngewebes	61
13.3.1	Aufarbeitung für die Lichtmikroskopie	61
13.3.1.1	Einbettung und Schneiden	61
13.3.1.2	LFB-PAS-Färbung zur Darstellung von Myelin	62
13.3.1.3	Axonfärbung – Versilberung nach Bielschowsky	63
13.3.1.4	NogoA-Färbung	63
13.3.1.5	Mac-3-Färbung	64
13.3.1.6	APP-Färbung	64
13.3.2	Aufarbeitung für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	65
13.3.2.1	Einbettung und Schneiden	65
13.3.3	Herstellung von Hirnlysaten für den Western Blot	66
13.4	Bewertung der Schnitte und Western Blots	66
13.4.1	LFB-PAS-Färbung	66
13.4.2	NogoA-, Mac-3- und APP-Färbung	67
13.4.3	TEM	67
13.4.4	Scion-Image	67
<b>14.</b>	<b>Standardabweichung und Signifikanz</b>	<b>68</b>
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>69</b>
<b>1.</b>	<b>Kultivierung und Charakterisierung von Schweine-Oligodendrozyten unter Standardbedingungen</b>	<b>69</b>
<b>2.</b>	<b>HPLC-Analyse zur Umwandlung der inaktiven Sst-Lactonform in die aktive Hydroxyform</b>	<b>70</b>
<b>3.</b>	<b>Simvastatin-Effekte auf primär kultivierte Schweine-Oligodendrozyten</b>	<b>71</b>
3.1	Hemmung der Cholesterinsynthese	71
3.2	Morphologische Auswirkungen	72
3.3	Kompensation der morphologischen Sst-Auswirkungen durch Intermediate des Cholesterinsyntheseweges	74
3.3.1	Transfektion mit FPP	76
3.4	Zelltod nach Applikation von Sst	77
3.5	Detektion apoptotischer Oligodendrozyten im Caspase-3 Assay	78
<b>4.</b>	<b>Einfluss von Simvastatin auf kleine G-Proteine</b>	<b>78</b>
4.1	p21Ras	79
4.1.1	Membranassoziation von p21Ras unter Sst	79
4.1.1.1	Kompensation der verringerten Membranassoziation durch Zugabe von Mevalonat	80

---

4.1.1.2	Kompensation der verringerten Membranassoziation durch Transfektion mit FPP	81
4.1.2	Bestimmung des GTP-gebundenen Anteils an p21Ras	82
4.2	Rho-Proteine	82
4.2.1	RhoA	83
4.2.1.1	Membranassoziation von RhoA	83
4.2.1.2	Zeitlicher Verlauf einer Sst-bedingten Verminderung der Membranassoziation von RhoA	84
4.2.1.3	Kompensation der verringerten Membranassoziation von RhoA durch Mevalonat	85
4.2.1.4	Bestimmung des GTP-gebundenen Anteils von RhoA	86
4.2.1.5	Zeitlicher Verlauf der Zunahme des GTP-gebundenen Anteils an RhoA durch Behandlung mit Sst	87
4.2.1.6	Interaktion von RhoA mit RhoGDI	88
4.2.2	Rho-Kinase Inhibitor	89
4.2.3	Aktivität von ROCK	90
4.2.4	Phosphorylierung der leichten Myosinketten	91
4.2.5	RhoG	92
4.2.5.1	Membranassoziation von RhoG	92
4.2.5.2	Bestimmung der Aktivität von RhoG	93
4.2.5.3	Transfektion mit RhoG-siRNA	94
4.2.6	Rac1 und Cdc42	95
4.3	Expression von p21Ras, sowie RhoA und RhoG unter Sst	97
<b>5.</b>	<b>Phosphorylierung von Akt</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>Aktivierung der SAPK/JNK</b>	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>ERK1/2-Aktivität unter Simvastatin</b>	<b>101</b>
7.1	Einfluss von NGF $\pm$ Sst auf die Aktivität von ERK1/2	102
<b>8.</b>	<b>Synthese von Myelinproteinen unter Simvastatin</b>	<b>104</b>
<b>9.</b>	<b>Morphologische und biochemische Effekte von Simvastatin auf kultivierte Mäuse-Oligodendrozyten</b>	<b>105</b>
9.1	Morphologie kultivierter Mäuse-OL unter Sst	106
9.2	Hemmung der Cholesterinsynthese in Mäuse-OL durch Sst	106
9.3	Aktivität von ERK1/2	107
<b>10.</b>	<b>In vivo Untersuchungen</b>	<b>108</b>
10.1	Cuprizon-Behandlung und Applikation von Sst	108
10.2	Demyelinisierung nach Behandlung mit Cuprizon	109
10.2.1	Demyelinisierung unter Cuprizon – LFB-PAS	109
10.2.2	Demyelinisierung unter Cuprizon – TEM	110

10.3	Remyelinisierung nach Absetzen von Cuprizon und Behandlung mit Sst	111
10.3.1	Remyelinisierung unter Sst – LFB-PAS	111
10.3.2	Remyelinisierung unter Sst – TEM	112
10.4	Evaluation der De- und Remyelinisierung – LFB-PAS und TEM	113
10.4.1	LFB-PAS	113
10.4.2	TEM	115
10.4.2.1	Bestimmung der G-ratio	116
10.5	NogoA-Färbung zur Auszählung von OL	117
10.6	Einfluss von Cuprizon und Sst auf Axone	118
10.6.1	Darstellung von Axonen nach Bielschowsky	118
10.6.2	APP-Färbung zur Darstellung geschädigter Axone	119
10.7	Mac-3-Färbung zur Darstellung aktivierter Mikroglia	120
10.8	Einfluss von Sst auf die Synthese von Myelinproteinen in vivo	121

## **IV Diskussion** **124**

<b>1.</b>	<b>Konversion von Simvastatin-Lacton zur Hydroxyform</b>	<b>124</b>
<b>2.</b>	<b>Morphologische Auswirkungen von Simvastatin auf Schweine-Oligodendrozyten</b>	<b>125</b>
<b>3.</b>	<b>Cholesterin und Intermediate der Cholesterinbiosynthese unter Simvastatin</b>	<b>126</b>
<b>4.</b>	<b>Simvastatin und kleine G-Proteine</b>	<b>128</b>
4.1	p21Ras – Membranassoziation und Aktivierung, MAPK-Aktivität	128
4.2	Rho-Proteine – Membranassoziation und Aktivierung	131
4.3	Rho-Proteine und Zytoskelett	136
4.3.1	RhoA	136
4.3.2	Rac1/Cdc42	140
4.3.3	RhoG	141
4.4	Apoptose	142
4.4.1	Aktivierung von SAPK via RhoA und Rac1/Cdc42	143
4.5	Myelinproteine	144
4.6	Proteinexpression unter Sst und Phosphorylierung von Akt	146
4.7	„Cross-talk“ zwischen kleinen G-Proteinen	147
4.8	OL – Sst – Kleine G-Proteine im Überblick	149
<b>5.</b>	<b>Wirkung von Simvastatin auf primär kultivierte Mäuse-Oligodendrozyten</b>	<b>151</b>
<b>6.</b>	<b>Einfluss von Simvastatin auf die Remyelinisierung in vivo</b>	<b>152</b>
6.1	Cuprizon-Modell – Demyelinisierung	152
6.2	Sst-Konzentrationen	153
6.3	Demyelinisierung unter Cuprizon und Remyelinisierung unter Sst – Morphologie	154
6.4	Demyelinisierung unter Cuprizon sowie Remyelinisierung unter Sst – Myelinproteine	157

Inhaltsverzeichnis	VI
<hr/>	
7. Einsatz von Simvastatin bei MS	158
8. Weitere Aspekte zum Einsatz von Simvastatin	160
<b>V Zusammenfassung</b>	<b>162</b>
<b>VI Literaturverzeichnis</b>	<b>165</b>
<b>VII Anhang</b>	<b>202</b>
Abkürzungsverzeichnis	
Danksagung	



# **I Einleitung**

## **1. Problemstellung**

Statine werden zur Senkung eines hohen Cholesterinspiegels eingesetzt. Die sich zusätzlich abzeichnenden antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte könnten einen Einsatz bei entzündlich-immunologisch mediierten Erkrankungen rechtfertigen. So werden Statine als Therapeutikum bei der Multiplen Sklerose (MS) diskutiert, bei der es infolge einer Autoimmunreaktion zur Schädigung von Oligodendrozyten und einer Demyelinisierung kommt. Bei der MS-Therapie ist allerdings neben der Immunmodulation auch eine Remyelinisierung zu bedenken, der Statine nicht entgegenstehen sollten. Untersucht wird daher, welchen Einfluss der bekannte Wirkmechanismus von Statinen auf Oligodendrozyten hat und ob sie eine Remyelinisierung beeinträchtigen.

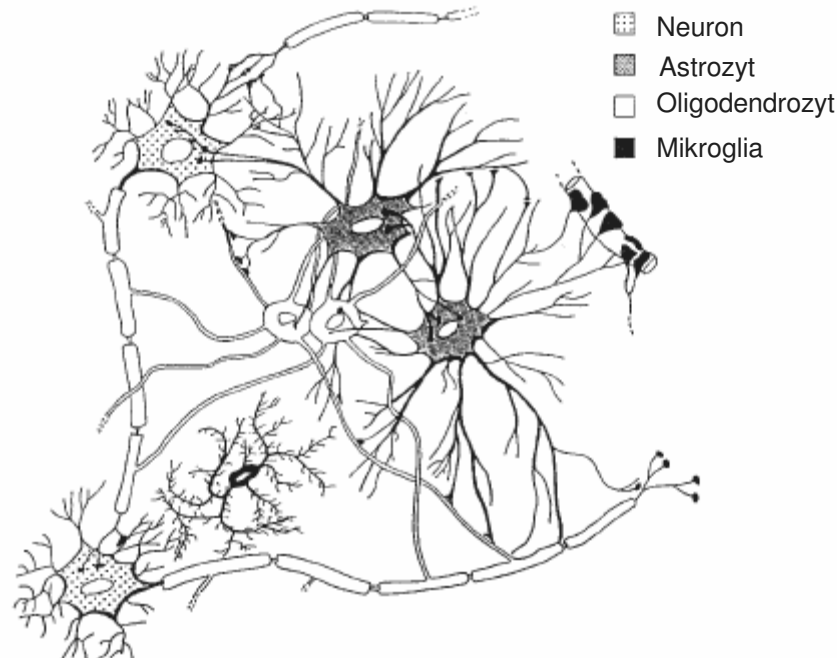
## **2. Neurale Zellen des Zentralnervensystems**

Als neurale Zellen bezeichnet man Neuren und Gliazellen (Abb. 1). Aus ca.  $10^{10-12}$  Neuren mit je  $10^{3-4}$  Synapsen pro Zelle entsteht im menschlichen Gehirn ein gigantisches Netzwerk mit einer großen Zahl an Kontaktstellen, bei dem Erregungen entlang der miteinander verbundenen Neurone mit einer Geschwindigkeit von bis zu 120 m/s laufen (DEITMER und KREUTZBERG, 2000). Die Architektur des Gehirns und die Geschwindigkeit der Erregungsleitung sind Grundlage für die schnelle Informationsverarbeitung.

Gegenüber den Nervenzellen gibt es etwa zehnmal mehr Gliazellen, die über die Hälfte des Nervensystemvolumens ausmachen und in Makro- sowie Mikrogliazellen eingeteilt werden (DEITMER und KREUTZBERG, 2000). Letztere sind nicht neuroektodermalen sondern mesodermalen Ursprungs (Lexikon der Neurowissenschaft, 2000).

Als zelluläres Abwehrsystem des ZNS zeichnen sich aktivierte Mikrogliazellen u.a. durch ihre Fähigkeit zur Proliferation, Migration und Antigen-Präsentation aus. Nach ihrer Aktivierung übernehmen sie auch phagozytotische Funktionen (NAKAJIMA und KOHSAKA, 2001).

Zu den Makrogliazellen des ZNS gehören Astrozyten und Oligodendrozyten (s. I.3.). Bei Astrozyten unterscheidet man aufgrund der Morphologie die fibrilläre von der protoplasmatischen Form. Die auch als Langstrahler bezeichneten fibrillären Astrozyten besitzen zahlreiche, schlanke und wenig verzweigte Fortsätze und kommen hauptsächlich in der weißen Substanz vor. Protoplasmatische Astrozyten, auch Kurzstrahler genannt, kommen in der grauen Substanz vor und sind durch dickere, reich verzweigte Fortsätze gekennzeichnet. In ihrer Membran besitzen Astrozyten neben Ionenkanälen auch Rezeptoren für Neurotransmitter. Sie übernehmen eine Vielzahl von Aufgaben, zu denen u.a. Aufrechterhaltung des Kalium-Haushaltes, Detoxifikation sowie Funktion als Leitstruktur während der Neurogenese zählen. Außerdem registrieren sie durch ihre Nähe zu Synapsen die dort stattfindenden chemisch gesteuerten elektrischen Aktivitäten und können über Regulation des Ionen-Milieus sowie Aufnahme überschüssiger Transmitter die Übertragung elektrischer Impulse an Synapsen modulieren (STEWART und ROSENBERG, 1979; TEMBURNI et al., 2001; SIMARD und NEEDERGARD, 2004).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der im ZNS vorkommenden neuralen Zellen** (BAUMANN und PHAM-DINH, 2001).

### **3. Oligodendrozyten (OL) und Myelin**

#### **3.1 Historie**

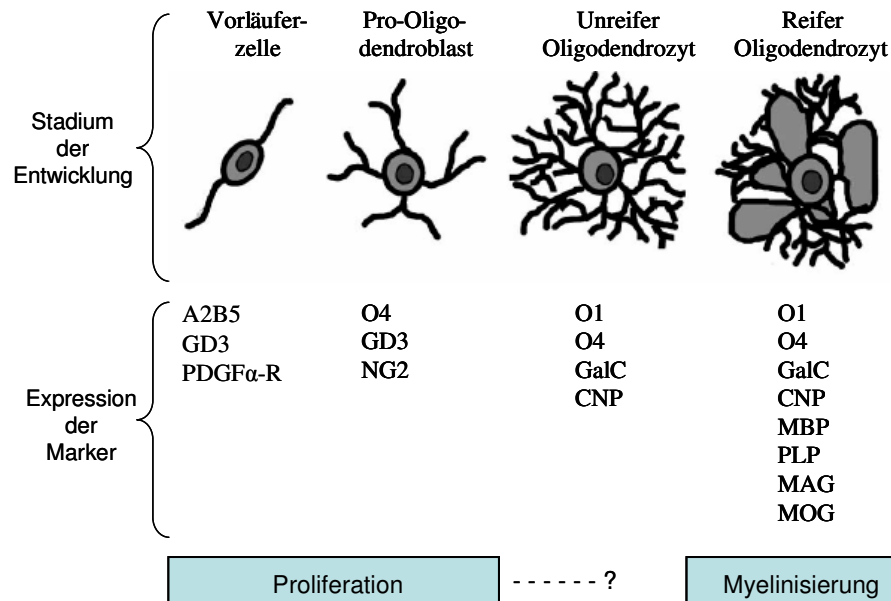
OL bilden im ZNS durch spiralförmige Umwicklung der Axone eine isolierende Markscheide, die 1854 von Rudolf Virchow mit dem Namen Myelin (griech. myelòs = Mark) belegt wurde (VIRCHOW, 1854). Louis-Antoine Ranvier erkannte, dass Myelin, aus Phospholipiden, Cerebrosiden und Sterolen bestehend, eine lipidreiche Hülle ist, welche Axone umgibt und elektrisch isoliert (RANVIER, 1878). Die ringförmigen Aussparungen der Markscheide, die myelinisierte Axone in Internodien (bemerkte Axonabschnitte bis zu 1 mm Länge) unterteilen und für die saltatorische Erregungsleitung von fundamentaler Bedeutung sind, tragen seinen Namen (Ranvier-Schnürringe oder -Knoten;  $\sim 0,5 \mu\text{m}$  Länge).

#### **3.2 Entwicklungsstufen von Oligodendrozyten**

Reife, myelinisierende OL entwickeln sich aus Vorläuferzellen, deren Entwicklungsstadien morphologisch und immunzytochemisch charakterisiert werden können (Abb. 2) (GARD und PFEIFFER, 1990; DUBOIS-DALQ und ARMSTRONG, 1992; HARDY und REYNOLDS, 1993).

OL-Vorläuferzellen sind durch die Expression der Marker A2B5 und GD3 gekennzeichnet. Sie können sich in vitro in einen Typ 2 Astrozyt oder einen OL entwickeln, weshalb diese Zellen auch als O-2A-Vorläufer bezeichnet werden (PRINGLE et al., 1997). Daraus entstehen multipolare Pro-Oligodendroblasten, die, wie alle anschließend folgenden Entwicklungsstadien, den Marker O4 exprimieren; nachfolgend sind unreife OL, ein Netzwerk von Fortsätzen bildend, durch das Auftreten von O1/Galaktocerebrosid (GalC) sowie 2'3'zyklische-Nukleotid-3'-Phosphodiesterase (CNP) gekennzeichnet (SOMMER et al., 1981). Im letzten Differenzierungsschritt entstehen reife OL, die durch Expression des basischen Myelinproteins (MBP), Proteolipidproteins (PLP), myelinassoziierten Glykoproteins (MAG) sowie des Myelin-OL-Glykoproteins (MOG) charakterisiert sind. (PFEIFFER et al., 1993).

Während der Myelinsynthese gehören OL zu den metabolisch aktivsten Zellen des ZNS; ein OL kann dabei bis zu 50 Axonsegmente myelinisieren (BUNGE, 1968; BUTT und RANSOM 1989; BJARTMAR et al., 1994).



**Abb. 2: Entwicklungsstadien der OL und ihre spezifischen Marker** (STANGEL und HARTUNG, 2002, mod.).

### 3.3 Steuerung der Entwicklung von OL

Die Steuerung der Entwicklung von OL durch Wachstumsfaktoren spielt auch bei demyelinisierenden Erkrankungen wie der MS eine wichtige Rolle, bei der im Prozess der Remyelinisierung überlebende Vorläuferzellen zu reifen OL differenzieren und demyelinisierte Axone wiederbemarken können (BRÜCK et al., 2003). Bei der Entwicklung von OL aus Vorläuferzellen konnten eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF (Platelet Derived Growth Factor; RAFF et al., 1988; RICHARDSON et al., 1988), CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor; LOUIS et al., 1993), IGF (Insulin-like Growth Factor; McMORRIS und DUBOIS-DALCQ, 1988), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor; ECCLESTON und SILBERBERG 1984) oder NRG1 (Neuregulin-1; NAVE und SALZER, 2006) in vitro die Proliferation, Differenzierung oder Reifung dieser Zellen beeinflussen. Diese Ergebnisse beziehen sich allerdings nur auf von Nagern (Maus, Ratte) gewonnene OL. Bei der Regeneration von Schweine-OL und bei der Remyelinisierung demyelinisierter Axone des Schweinehirns erwies sich hingegen NGF (Nerve Growth Factor), das zur Familie der Neurotrophine (NT) gehört, als effizient, was es folglich zur Behandlung von Entmarkungskrankheiten interessant machte (ALTHAUS et al., 1992; ROHDE, 1998; HEMPSTEAD und SALZER, 2002; ALTHAUS, 2004; ROSENBERG et al., 2006).

### **3.4 Myelin**

#### **3.4.1 Morphologie**

Die periodische Struktur des Myelins entsteht aus einer spiralförmigen Umwicklung der Axone durch oligodendrogliale Plasmamembranfortsätze (SJÖSTRAND, 1949; BUNGE et al., 1962; PETERS, 1964; BUTT und RANSOM, 1989). Voraussetzungen der Myelinisierung sind: Migration von OL zu unbemerkten Axonen, Auswachsen von Fortsätzen, Erkennung von Axonen sowie nachfolgende Adhäsion und Umwicklung. Nach der Entstehung von 3-4 Lagen bewirkt die Verdrängung des Großteils an Zytoplasma ein enges Aneinanderliegen der Plasmamembranen (McLAURIN und YONG, 1995). So entsteht die Struktur des Myelins mit alternierenden elektronendichten Linien, bei denen man die dichtere „major dense line“, die den Zellinnenseiten der gegenüberliegenden Membranschichten mit Zytoplasma entspricht, von der „intraproduct line“, welche die Zellaußenseiten der Membran darstellt, unterscheidet (SJÖSTRAND, 1949; RAINE et al., 1984). Die Myelinisierung beginnt beim Mensch gegen Ende der ersten Schwangerschaftshälfte, erreicht ihren Höhepunkt innerhalb des ersten Lebensjahres und kann sich in einigen Arealen bis zum 20. Lebensjahr fortsetzen (YAKOVLEV und LECOURS, 1966; STANGEL und HARTUNG, 2002).

#### **3.4.2 Biochemie**

Während der Synthese und Kompaktierung von Myelin ist eine hohe Produktion von Proteinen und Lipiden sowie deren Transport zu den oligodendroglialen Fortsätzen notwendig (BAUMANN und PHAM-DINH, 2001). Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Trockengewicht des Myelins zu 70-85 % aus Lipiden und zu 15-30 % aus Proteinen besteht (MORELL et al., 1994).

##### **3.4.2.1 Myelinlipide**

Mit einem Lipidanteil von 70-85 % (Trockengewicht) unterscheidet sich Myelin von allen anderen biologischen Membranen, die nur zu etwa 35-40 % (Trockengewicht) aus Lipiden bestehen (NORTON und CAMMER, 1984). Myelin enthält Cholesterin, Phospholipide und Glykolipide in einem molaren Verhältnis von 4:3:2 bis 4:4:2, von denen einzig die Glykosphingolipide, besonders Galaktocerebroside (GalC) und

Galactosulfocerebroside (Sulfatide), speziell in Myelin bzw. OL vorkommen (RAFF et al., 1978; BAUMANN und PHAM-DINH, 2001).

Einen wesentlichen Anteil bei der Myelinisierung übernimmt Cholesterin per se, welches 27,7 % der Myelinlipide ausmacht (MORELL et al., 1994). Im erwachsenen Gehirn ist der hohe Cholesterinanteil im Wesentlichen auf das Myelin zurückzuführen (BJÖRKHELM und MEANEY, 2004). Die enorme Bedeutung für die Myelinsynthese konnte an Mausmutanten gezeigt werden, deren OL nicht in der Lage waren Cholesterin zu synthetisieren. Das Auftreten von Tremor und Ataxie war die Folge dieser Defizienz (SAHER et al., 2005). Wichtig sind aber auch Vorstufen wie Farnesylpyrophosphat (FPP) oder Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), welche zur Verankerung von Membranproteinen dienen (AGRANOFF und HAJRA, 1994). Über diese Prenylierung erfolgt neben der Assoziation von kleinen G-Proteinen auch eine Assoziation von CNP mit der Plasmamembran (BRAUN et al., 1991).

#### **3.4.2.2 Myelinproteine**

Als Hauptvertreter der ZNS-Myelinproteine sind MBP und PLP zu nennen. MBP tritt beim Mensch in 4 Isoformen auf und macht ~30 % der Myelinproteine aus (CAMPAGNONI und MACKLIN 1988; KAMHOLZ et al., 1988; BAUMANN und PHAM-DINH, 2001). Auf der zytoplasmatischen Seite der Membran exprimiert, trägt es durch Interaktion mit Membranphospholipiden und MBP-Molekülen der gegenüberliegenden Seite zur Bildung und Stabilisierung kompakter Myelinschichten bei (DEBER und REYNOLDS, 1991; PFEIFFER et al., 1993). PLP und DM-20 stellen mit ~50 % den größten Anteil der Myelinproteine dar (BAUMANN und PHAM-DINH, 2001). Nach der Myelinkompaktierung bewirkt PLP die gegenseitige Verankerung und Stabilisierung der gestapelten Myelinschichten (BOISON et al., 1995; GRIFFITH et al., 1995, KLUGMANN et al., 1997). Zu einer kleineren aber wichtigen Gruppe der Myelinproteine gehören: Wolfgram Protein (CNP), MAG und MOG. CNP, das etwa 4 % der Myelinproteine ausmacht, ist auf der zytoplasmatischen Seite der Membran von hauptsächlich nicht kompaktiertem Myelin zu finden (BRAUN et al., 1988; TRAPP et al., 1988). Die Assoziation mit der Zytoplasmamembran der OL erfolgt durch Isoprenylierung (BRAUN et al., 1991). MAG macht ca. 1 % der Myelinproteine aus und ist bei der Kontaktaufnahme von OL mit Axonen von Bedeutung (MEYER-FRANKE und BARRES 1994; FILBIN 1996). MOG ist als ZNS-spezifisches

Glykoprotein in den äußersten Lamellen von kompaktem Myelin und auf der Plasmamembran der OL, besonders auf Fortsätzen, lokalisiert (BRUNNER et al., 1989; LEBAR et al., 1976, LEBAR et al., 1986). Es ist das einzige ZNS-Protein, das in einem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einer induzierbaren MS-ähnlichen Krankheit, gleichzeitig eine T-Zell vermittelte entzündliche Immunreaktion und eine demyelinisierende Antikörperantwort auslösen kann (LININGTON et al., 1993; AMOR et al., 1994).

#### **4. Multiple Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste Ursache neurologisch bedingter Erkrankungen bei jungen Erwachsenen, deren erste Symptome zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr auftreten. Schätzungen zufolge beträgt die Zahl der weltweit betroffenen Patienten 2,5 Millionen, wobei Frauen zweimal so häufig betroffen sind wie Männer (COMPSTON und COLES, 2002).

Das Krankheitsbild der MS, das zu den facettenreichsten der Neurologie zählt, wurde erstmals von J. M. Charcot 1868 näher beschrieben (CHARCOT, 1868). Aus bisher ungeklärten Gründen kommt es bei der MS zu einer Autoimmunreaktion mit Ausbildung entzündlicher Plaques, die durch Schädigung oder Verlust von OL und OL-Vorläuferzellen, Myelin (Demyelinisierung) und auch Axonen gekennzeichnet sind (BRÜCK et al., 1994; STECK et al., 1999; STEINMAN, 2001; HEMMER et al., 2002). Frühe Anzeichen der Krankheit sind z.B. Störungen der Gefühlswahrnehmung in Armen und Beinen, des Sehens, Sprechens und des Gleichgewichts.

Der Verlauf der Erkrankung ist individuell verschieden. Die schubförmig remittierende MS (RR-MS) ist die häufigste Form und zeichnet sich durch unvorhersehbare Schübe mit dazwischen liegenden Remissionsphasen aus. Ohne Behandlung geht die RR-MS bei 50-60 % der Patienten nach 10-15 Jahren in eine sekundär progrediente Form (SP-MS) über, die durch eine allmähliche und kontinuierliche Verschlechterung der Symptome gekennzeichnet ist (LUBLIN und REINGOLD, 1996).

## 4.1 Therapeutische Ansätze zur Behandlung der MS

### A) Immunmodulation

Da die Ursache für die Entstehung der MS bisher nicht geklärt ist, kann die derzeitige Therapie nicht spezifisch ausgerichtet sein. Es gibt jedoch Ansätze, die Anzahl der Schübe zu reduzieren und die auftretenden Symptome zu behandeln.

Neben dem kurzfristigen Einsatz von Kortikosteroiden beim akuten Schub sind es langfristig antiinflammatorisch / immunmodulatorisch wirkende Medikamente, die zurzeit zum Einsatz kommen. Eines dieser Präparate ist z.B. Interferon beta (IFN- $\beta$ ), ein Immunglobulin, das bei Entzündungsreaktionen im Körper ausgeschüttet wird und immunmodulatorisch wirkt (MSTKG, 1999; MSTKG, 2001). IFN- $\beta$  hindert T-Lymphozyten, die Blut-Hirnschranke zu passieren und hemmt die Produktion von Entzündungsmediatoren. Eine Alternative zur IFN- $\beta$  Therapie stellt die Applikation von Glatirameracetat dar, welches dem MBP ähnelt und an dessen Stelle Angriffspunkt aktiver Immunzellen sein soll (HOHLFELD, 1999; HE et al., 2000; COMI et al., 2001). Da alle diese Medikamente aber nur Teilerfolge erzielt haben, ist man weiterhin auf der Suche, die Therapielage zu verbessern. Vor einiger Zeit begann man Statine in diese Überlegung einzubeziehen, da sie, neben einer Indikation als Lipidsenker, aufgrund von Tierversuchen offensichtlich auch immunmodulatorische Eigenschaften entwickeln. Bei Mäusen, die an einer EAE leiden, konnte gezeigt werden, dass lipophile Statine wie z.B. Simvastatin, die die Blut-Hirnschranke durchqueren können, die Bildung von spezifischen T-Zellen sowie Entzündungsfaktoren und -mediatoren reduzieren und damit eine neue Perspektive in der MS-Therapie darstellen (NEUHAUS et al., 2002; WEKERLE, 2002; YOUSSEF et al., 2002; SENA et al., 2003; NEUHAUS et al., 2005; WEBER et al., 2005). In der Tat sind bereits Statine bei MS-Patienten in ersten Versuchen eingesetzt worden (SENA et al., 2003; VOLLMER et al., 2004). Eine immunmodulatorisch / antiinflammatorische Therapie der MS sollte aber auf jeden Fall so ausgerichtet sein, dass die für eine Remyelinisierung notwendigen Signalwege und Prozesse nicht beeinträchtigt werden.

### B) Remyelinisierung

Während der MS kommt es neben einer Schädigung und Zerstörung von OL und Myelin auch zu einer teilweisen, allerdings physiologisch insuffizienten Wiederherstellung von Myelin. Bei der Remyelinisierung werden demyelinisierte Herde



durch überlebende reife oder einwandernde differenzierende OL-Vorläuferzellen wiederbemerkt, was zum Bild der so genannten „shadow-plaques“ führt (BUNGE et al., 1961; PRINEAS et al., 1993; RAINE und WU, 1993; BRÜCK et al., 2003). Neu gebildetes Myelin ist dünner als das ursprüngliche und weist kürzere internodale Abstände auf (BLAKEMORE, 1973; STANGEL und HARTUNG, 2002; BRÜCK et al., 2003).

Zur Untersuchung der De- und Remyelinisierung im Tiermodell können auf toxischem (Cuprizon – s. III.10.1, Ethidiumbromid, Lysolecithin), autoimmunem (z.B. MOG) und viralem Weg (Theiler's Murines Encephalomyelitis Virus, TMEV) Demyelinisierungen hervorgerufen werden (MILLER und RODRIGUEZ, 1995; PÖHLAU et al., 1998; MATSUSHIMA und MORELL, 2001). Die autoimmunologische Pathogenese der MS kann am EAE-Modell, einer T-Zell vermittelten Autoimmunkrankheit, bei der die Immunreaktion gegen Bestandteile des Myelins gerichtet ist, untersucht werden (BUddeBERG et al., 2004).

Induktion und Förderung der Remyelinisierung konnten in entsprechenden Tiermodellen durch Applikation von Wachstumsfaktoren oder remyelinisierenden Autoantikörpern sowie durch Transplantation von OL-Vorläufern oder Stammzellen gezeigt werden (YAO et al., 1995; ASAKURA und RODRIGUEZ, 1998; BRÜSTLE et al., 1999; LEARISH et al., 1999; ALTHAUS et al., 2004). Eingang in die Therapie der MS haben solche Ansätze nicht gefunden, obgleich dadurch ein wesentlicher Fortschritt therapeutisch zu erzielen wäre.

## 5. Statine

Statine sind hochpotente Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA (HMG-CoA) Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese (Abb. 3). Durch Hemmung der Mevalonatsynthese wird die Bildung von Cholesterin und anderen Intermediaten blockiert. Die gute Verträglichkeit und der spezifische Wirkmechanismus haben dazu geführt, dass Statine mittlerweile von ca. 25 Millionen Menschen weltweit zur Behandlung der Hypercholesterinämie eingenommen werden (GREENWOOD et al., 2006). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen einem hohen Cholesterinspiegel und dem Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung haben sich Statine auch in der Primär- und Sekundärprävention koronarer Herzkrankheiten bewährt (LA ROSA et al., 1999; HESS et al., 2000; BAIGENT et al., 2005).

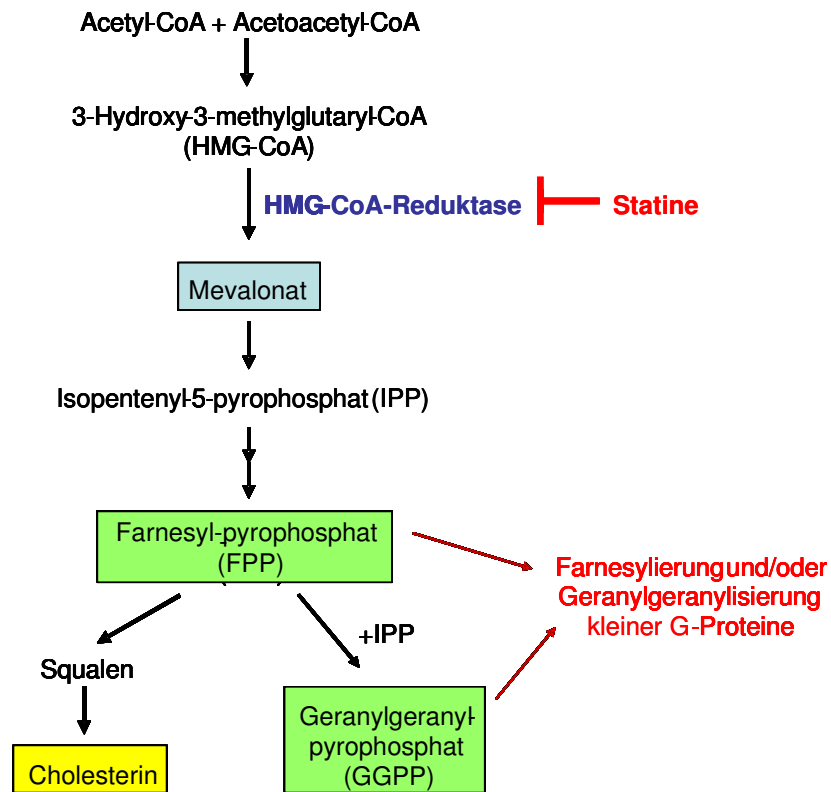


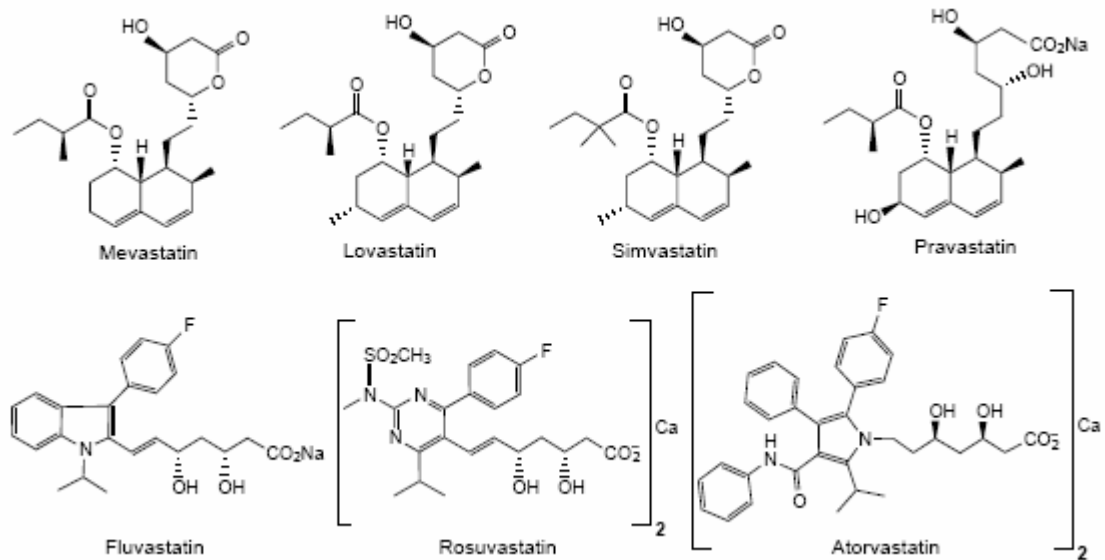
Abb. 3: Cholesterinsynthese und Hemmung der HMG-CoA Reduktase durch Statine.

### 5.1 Struktur und Einteilung der Statine

Allen Statinen gemeinsam ist eine strukturelle Komponente, die dem HMG-Teil von HMG-CoA entspricht. Sie unterscheiden sich durch den Umfang der kovalent gebundenen Gruppen und den daraus resultierenden unterschiedlich hydrophoben Eigenschaften (ISTVAN und DEISENHOFER, 2001; ISTVAN, 2003). Derzeit sind sechs verschiedene Statine auf dem Markt: Lovastatin (Mevacor), Simvastatin (Zocor), Pravastatin (Lipostat, Pravachol), Fluvastatin (Lescol), Atorvastatin (Sortis, Lipitor) und Rosuvastatin (Crestor), die strukturell in Typ-1 und Typ-2 Statine eingeteilt werden (Abb. 4) (ISTVAN, 2003). Während Simvastatin, Lovastatin, Atorvastatin und Rosuvastatin hydrophobe Eigenschaften besitzen, ist Pravastatin durch seinen stark hydrophilen Charakter gekennzeichnet.

Die Entwicklung der Substanzklasse begann 1976 mit der Isolierung des auch als Kompaktin bekannten Mevastatin aus dem Schimmelpilz *Penicillium citrinum* (ENDO et al., 1976). Das strukturell verwandte Lovastatin wird aus *Aspergillus*-Pilzen hergestellt (HENWOOD und HEEL, 1988). Simvastatin und Pravastatin sind chemisch

modifizierte Analoge von Lovastatin, während Fluvastatin und Atorvastatin rein chemisch synthetisierte Substanzen darstellen (TODD und GOA, 1990; McTAVISH und SORKIN, 1991; PLOSKER und WAGSTAFF, 1996; LEA und McTAVISH, 1997).



**Abb. 4: Struktur der am Markt zugelassenen Statine (WEITZ-SCHMIDT, 2002).** Alle Statine besitzen eine strukturelle Komponente, die in ihrer aktiven Form dem HMG ähnlich ist. Typ-1 Statine (obere Zeile) sind durch das Vorhandensein eines Decalin-Rings gekennzeichnet. Typ-2 Statine (untere Zeile) enthalten neben der HMG-ähnlichen Komponente eine Fluorphenyl- und Methyl ethylgruppe.

## 5.2 Pleiotrope Effekte von Statinen

Durch Inhibition des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese wird die Produktion von Intermediaten wie Mevalonat, Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) gehemmt (Abb. 3), die ihrerseits wichtige biologische Funktionen haben. So sind FPP und GGPP für die Isoprenylierung und Funktion kleiner G-Proteine wichtig. Auf eine Inhibition dieser Intermediate wird eine Vielzahl cholesterinunabhängiger, so genannter pleiotroper Effekte, zurückgeführt. Dazu zählen eine Verbesserung der Endothelfunktion und des Blutflusses, eine erhöhte Stabilität atherosklerotischer Plaques, eine Verringerung von oxidativem Stress und Entzündungen mit Effekt auf das Immunsystem (LIAO, 2002; LIAO und LAUFS, 2005). Neben einem antiproliferativen Effekt von Statinen auf Lymphozyten und andere Zelltypen konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass sie zusätzlich auch die Funktion von T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen beeinflussen

(CHAKRABARTI und ENGLEMAN, 1991; CUTHBERT und LIPSKY, 1991; GREENWOOD et al., 2006; PENG et al., 2006). Voraussetzungen für eine Aktivierung dieser Zellen sind die Expression von Zytokinen, Zytokinrezeptoren sowie Adhäsionsmolekülen, deren Expression durch Statine gehemmt wurde (GREENWOOD et al., 2006; STANCU und SIMA, 2001; WEITZ-SCHMIDT, 2002; VAUGHAN et al., 2000). Zum anderen könnten Statine auch unabhängig von ihrer Enzymhemmung eine Wirkung auf das Immunsystem entfalten. So wurde über eine selektive Bindung und Hemmung des Leukozytenantigen 1 (LFA-1) via Lovastatin berichtet (WEITZ-SCHMIDT et al., 2001). Hier scheint Lovastatin direkt eine Domäne von LFA-1 zu blockieren (WEITZ-SCHMIDT et al., 2004).

Die oben aufgeführten Eigenschaften haben Statine für die Therapie immunvermittelter Krankheiten wie MS interessant gemacht (s. I.4.1). Für eine Wirkung im ZNS dürften sich aber nur lipophile Statine wie Simvastatin und Lovastatin eignen, die in der Lage sind, die Blut-Hirnschranke in einem relevanten Ausmaß per Diffusion zu passieren (BÖSEL und ENDRES, 2005). Da allerdings die Wirkung von Statinen auf neurale Zellen noch nicht geklärt ist, bleibt deren Einsatz bei Autoimmunerkrankungen wie der MS jedoch umstritten und bedarf weiterer Studien und Forschungen (GREENWOOD et al., 2006).

## **6. Kleine G-Proteine – GTPasen**

G-Proteine lassen sich in drei Untergruppen einteilen: heterotrimere große G-Proteine, monomere kleine G-Proteine (GTPasen) und Translationsfaktoren. Kleine GTPasen sind monomere GTP-bindende Proteine mit einer Molekularmasse von 20 – 40 kDa. Zurzeit sind über 100 verschiedene GTPasen in Eukaryonten bekannt, die sich nach phylogenetischen Gemeinsamkeiten und Unterschieden in 5 Familien einteilen lassen: Ras, Rho/Rac, Rab, Sar1/Arf und Ran. Sie sind an der Regulation der Genexpression (Ras und Rho), des Zytoskeletts (Rho/Rac), des Vesikeltransports (Rab und Sar1/Arf), des Transports zwischen Zytoplasma und Nukleus sowie der Mikrotubuliorganisation (Ran) beteiligt (TAKAI et al., 2001; McTAGGART, 2006). Alle kleinen G-Proteine haben gemeinsame Aminosäuresequenzen, die für die Interaktion mit GDP und GTP sowie die GTPase Aktivität verantwortlich sind (BOURNE et al., 1991; VALENCIA et al., 1991). Ebenso findet man eine Region, die mit dem entsprechenden Effektor der Signalkaskade interagieren kann. Ras, Rho/Rac/Cdc42 und Rab Proteine haben

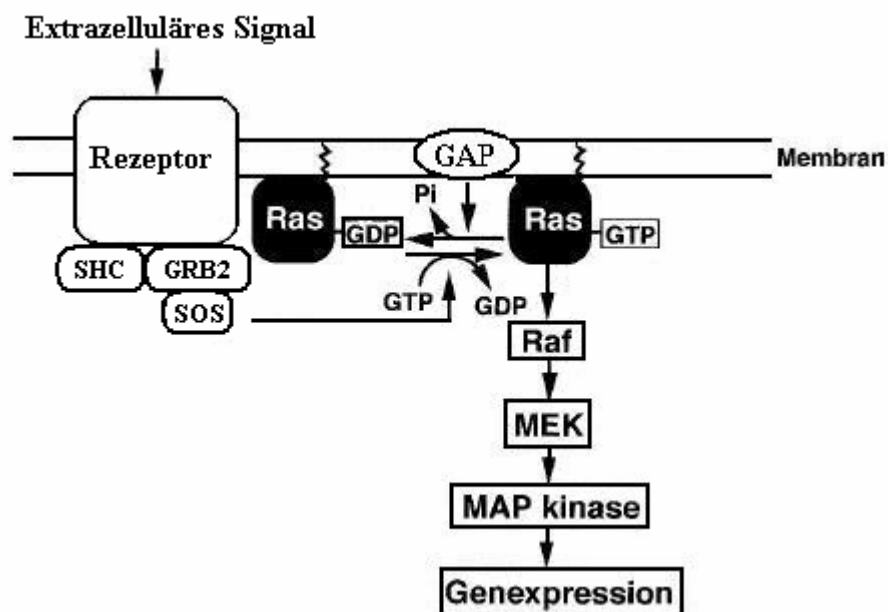
zusätzlich an ihrem COOH-Ende Sequenzen, die posttranslational modifiziert werden können. Dazu zählt das Anhängen von Farnesyl-, Geranylgeranyl-, Palmitoyl- oder Methyl-Resten. Diese Modifikationen stellen eine notwendige Voraussetzung für die Funktion der kleinen GTPasen dar. So sind Ras-Proteine über ihre Farnesylgruppe und die meisten Rho-Proteine über ihre Geranylgeranylgruppe mit der Membran verankert. Die kleinen G-Proteine fungieren als molekulare Schalter in einer Vielzahl von Signalkaskaden (s. I.6.1 und I.6.2). Prinzipiell wird dabei das am Protein gebundene GDP (inaktive Form) mit Hilfe von GEFs (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren) gegen GTP ersetzt (aktive Form). Dies ermöglicht das Binden eines Effektors und damit das Auslösen einer Signalkaskade. Nach der Signalübertragung wird die aktive Form über GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) durch Phosphatbspaltung wieder in die inaktive GDP-gebundene Form überführt.

## 6.1 Ras-Proteine

Ras-Proteine der Säugetiere haben eine Größe von 21 kDa (p21Ras) und treten in vier Formen auf: H-Ras, K-Ras-4A, K-Ras-4B und N-Ras (BREDEL und POLLAK, 1999; TAKAI et al., 2001). Sie regulieren Signalwege, die für Zellwachstums- und Differenzierungsprozesse sowie für die Apoptose entscheidend sind. Die Aktivierung von Ras-Proteinen wird durch extrazelluläre Signale induziert, die einen Rezeptor mit einer intrinsischen oder assoziierten Tyrosinkinase-Aktivität stimulieren (EGAN et al., 1993; GALE et al., 1993; LI et al., 1993). So binden z.B. im Nervensystem Neurotrophine wie NGF an spezifische Trk-Rezeptor-Tyrosinkinasen und aktivieren den Ras-MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalweg (Abb. 5) (ALTHAUS und RICHTER-LANDSBERG, 2000; TAKAI et al., 2001). Das Binden von NGF bewirkt eine Dimerisierung von TrkA, die mit der Autophosphorylierung der Tyrosinreste des Rezeptors einhergeht und eine Interaktion mit dem Adaptorprotein SHC ermöglicht. An das durch TrkA phosphorylierte SHC bindet im nächsten Schritt GRB2. Über zwei SH3-Domänen kann dies mit SOS wechselwirken, dem am besten charakterisierten GEF für Ras-Proteine, und es entsteht ein Rezeptor-Adaptor-GEF-Komplex. Auf diesem Weg wird die Aktivierung des Plasmamembran-gebundenen Ras durch SOS ermöglicht. Für die Funktion von Ras ist eine Assoziation mit der Plasmamembran, die durch Farnesylierung bewerkstelligt wird, Voraussetzung. Im aktivierten Zustand rekrutiert Ras Raf und initiiert eine weiterführende, über ERK1/2

laufende Signalkaskade (VOJTEK et al., 1993; WARNE et al., 1993). ERK1/2 gehören zu den MAPK, die im aktivierten Zustand Substrate im Zytosol oder Transkriptionsfaktoren nach Translokation in den Zellkern phosphorylieren (CREWS et al., 1992; ROBINSON und COBB, 1997; PEARSON et al., 2001).

Die Aktivierung von ERK1/2 in OL ist ein essentieller Schritt für die Ausbildung der Fortsätze (STARIIHA et al, 1997; STARIIHA und KIM, 2001). Mit NGF behandelte OL zeigten ein verstärktes Fortsatzwachstum, das mit einer Aktivierung von ERK1/2 einherging (ALTHAUS et al., 1992; ALTHAUS et al., 1997).



**Abb. 5:** Aktivierung und Kaskade des Ras-MAPK-Signalweges (TAKAI et al., 2001, mod.).

## 6.2 Rho-Proteine

Die meisten Mitglieder der Rho-Proteinfamilie lassen sich anhand ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und biologischen Funktion in eine von sechs Unterfamilien einteilen: RhoA-verwandte Proteine (RhoA, RhoB, RhoC), Rac1-verwandte Proteine (Rac1, Rac2, Rac3 und RhoG), Cdc42-verwandte Proteine (Cdc42, TC10, TCL, Chp/Wrch-2, Wrch1), Rnd-Proteine (Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3), RhoBTB-Proteine und Miro-Proteine (Abb. 6) (WENNERBERG und DER, 2004). Die 20-30 kDa großen Moleküle regulieren ein breites Spektrum zellulärer Funktionen, wie die Organisation und den Umbau des Aktinzytoskeletts, Zelladhäsion, Migration, Zellpolarität, Zellteilung, Vesikeltransport und Onkogenese. Die von uns untersuchten

Rho-Proteine werden sämtlich posttranslational durch das Anhängen von Geranylgeranyl modifiziert (WENNERBERG und DER, 2004).

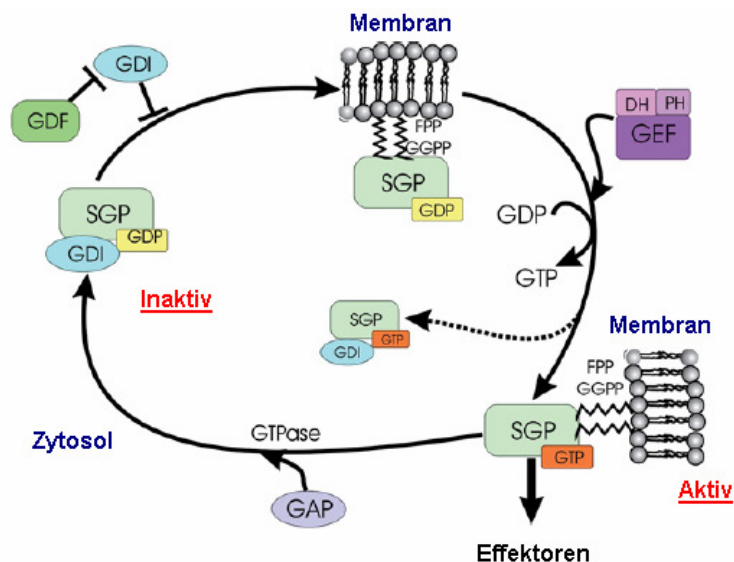


**Abb. 6: Phylogenetischer Baum der Rho-Proteine sowie weiterer Vertreter kleiner GTPasen.** Aufgrund der Aminosäuresequenzen und funktionellen Aspekte können Rho-Proteine in 6 farblich gekennzeichnete Unterfamilien eingeteilt werden: RhoA-Verwandte, Rac-Verwandte, Cdc42-Verwandte, Rnd-Proteine, RhoBTB-Proteine und Miro-Proteine. (WENNERBERG und DER, 2004).

Wie alle anderen kleinen G-Proteine haben die Mitglieder der Rho-Familie im aktivierten, GTP-gebundenen Zustand eine erhöhte Affinität zu einer Reihe von Effektoren und können durch deren Aktivierung eine Signalkaskade auslösen. Die Regulation erfolgt wie bei p21Ras durch GEFs (~70 Mitglieder) sowie GAPs (~80 Mitglieder) (SCHMIDT und HALL, 2002; MOON und ZHENG, 2003; WENNERBERG und DER, 2004). Zusätzlich gibt es einen dritten Regulationsmechanismus von Rho-Proteinen über GDIs (Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren) (OLOFSSON, 1999; DER MARDIROSSIAN und BOKOCH, 2005). Diese binden als zytoplasmatische Regulatoren den prenylierten Teil von Rho-Proteinen. Eine daraus resultierende Abschirmung dieser Gruppe verhindert die Membranassoziation und Aktivierung von Rho-Proteinen (Abb. 7). Derzeit sind drei humane Rho-GDIs identifiziert worden, deren Aktivität durch verschiedene Proteine und Lipide reguliert

werden kann (CHUANG et al., 1993; YAMASHITA und TOHYAMA, 2003; McTAGGART, 2006).

Infolge des Netzwerks der Regulationsmechanismen über GEFs, GAPs und GDIs sowie der zum Teil gewebe- und zellabhängigen Expression der Rho-Proteine ist die Hemmung oder Aktivierung bestimmter Signalkaskaden durch extrazelluläre Stimuli sehr komplex und nur zum Teil aufgeklärt. Zusätzlich bestehen zwischen den Rho-Signalwegen regulatorische Querverbindungen. So kann die gegenseitige Stimulation der GTPasen, die Aktivierung gemeinsamer Effektoren oder das Wirken unspezifischer GEF's eine Aktivierung unterschiedlicher GTPasen induzieren, was durchaus zu ähnlichen aber auch gegensätzlichen Effekten führen kann.



**Abb. 7:** Regulation kleiner Rho-Proteine (small G-Proteins – SGP) durch Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI), GDI-Verdrängungs-Faktoren (GDF), Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und GTPase aktivierende Proteine (GAP) (McTAGGART, 2006, mod.).

### 6.2.1 Zytoskelett und Adhäsion

Das für die mechanische Stabilisierung von eukaryontischen Zellen verantwortliche Zytoskelett lässt sich in drei am Aufbau beteiligte Strukturfilamente einteilen: Mikro- bzw. Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Diese setzen sich wiederum aus jeweils unterschiedlichen Proteinklassen zusammen. Die einzelnen Komponenten bilden aufgrund ihrer Fähigkeit zu schnellen Auf- und Abbauvorgängen ein hochdynamisches System. Bei der in OL stattfindenden Fortsatzbildung, -verlängerung und -verzweigung sowie der Myelinbildung ist das aus Mikrotubuli und



Aktinfilamenten bestehende Zytoskelett maßgeblich beteiligt (WOOD und BUNGE, 1984; WILSON und BROPHY 1989; BARRY et al., 1996; TAKAI et al., 2001). Während der Myelinbildung in reifen OL stehen die Strukturfilamente in enger Verbindung mit Myelinproteinen (SONG et al., 2001).

In Antwort auf extrazelluläre Signale sind Rho-, Rac- und Cdc42-Proteine für eine Regulation des Zytoskeletts von großer Bedeutung (BOIVIN et al., 1996; TAKAI et al., 2001). Das infolge der Polymerisation vieler Aktin-Monomere entstehende filamentöse Aktin ist Bestandteil von Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien. Rho-Proteine regulieren die Formierung und Kontraktion von Stressfasern, Aktinbündel, die die Zelle durchziehen und über Integrine an der extrazellulären Matrix gekoppelt sind (RIDLEY und HALL, 1992). Durch Stimulation der Rho-Proteine wird die Rho-Kinase aktiviert, welche wiederum u.a. eine Phosphorylierung der leichten Myosin-Ketten reguliert. Infolge der Phosphorylierung kommt es zu einer Aktin-Myosin-Interaktion, welche zu einer Kontraktion der Stressfasern führt. Cdc42-Proteine regulieren die Ausbildung von Filopodien. Diese dünnen länglichen Ausstülpungen der Plasmamembran, die man vorwiegend in beweglichen Zellen findet, bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten, welche durch aktinbindende Proteine miteinander vernetzt sind (KOZMA et al., 1995; NOBES und HALL 1995). Bei der Aktivierung von Rac kommt es zur Bildung von Lamellipodien. Diese flachen Ausstülpungen der Membran bestehen aus netzwerkartig polymerisiertem Aktin und sind der Lage, neue adhäsive Kontakte auszubilden und die Zelle bei der Migration voranzutreiben (RIDLEY et al., 1992).

## **7. Intention der Arbeit**

Therapeutische Ansätze sollten bei der MS prinzipiell sowohl immunmodulatorisch / antiinflammatorisch als auch remyelinisierend ausgerichtet sein. Seit kurzem wird der Cholesterinsenker Simvastatin (Sst) aufgrund seiner pleiotropen Effekte, die u.a. eine Immunmodulation und Antiinflammation einschließen, als mögliches Therapeutikum bei der Behandlung von MS diskutiert. Bei der Therapie der MS ist jedoch zu bedenken, dass durch Sst eine autochthone Remyelinisierung nicht beeinträchtigt werden sollte. Sst hemmt die Cholesterinsynthese auf der Ebene von Mevalonat (s. Abb. 3), wodurch Intermediate wie FPP, GGPP und auch Dolichol nicht mehr synthetisiert werden. Dolichol ist für die Glykosylierung von Rezeptoren notwendig und könnte deren Effektivität bei Mangel herabsetzen (SIDDALS et al., 2004). Das Hauptaugenmerk

dieser Arbeit gilt jedoch der Funktion kleiner G-Proteine bei fehlendem Nachschub von FPP und GGPP. Zum Beispiel könnte eine wichtige Signalkaskade, die über p21Ras läuft und in OL u.a. zum Fortsatzwachstum führt, infolge der Sst-Behandlung in ihrer Effizienz beeinträchtigt sein. Da oligodendrogliales Fortsatzwachstum für einen Kontakt zum Axon unabdingbar ist, könnte sich somit der gesamte (Re)Myelinisierungsprozess verzögern. In vitro und in vivo Ergebnisse dieser Arbeit sollten Hinweise darauf geben, ob Sst die Remyelinisierung beeinflusst und sein Einsatz für die Behandlung einer MS zu rechtfertigen ist. Dazu bestand folgender Arbeitsplan:

A) In vitro Untersuchungen der Effekte von Sst auf primär kultivierte Schweine-OL:

- Morphologische Auswirkungen
- Einfluss auf die Cholesterinbiosynthese
- Effekte auf die Membranassoziation von p21Ras, MAPK-Aktivität und Neusynthese von Myelinproteinen
- Beteiligung von RhoA, RhoG, Rac1 sowie Cdc42 und den darüber vermittelten Signalkaskaden
- Auswirkungen auf kultivierte Mäuse-OL als Grundlage für in vivo Untersuchungen

B) In vivo Untersuchungen:

Da in vitro Ergebnisse nicht zwangsläufig mit in vivo Resultaten korrelieren, sollte auch der Einfluss von Sst auf die Remyelinisierung in vivo untersucht werden. Als geeignetes Modell bot sich eine Demyelinisierung über Cuprizon in C75BL/6N Mäusen an. Es kommt hier zu einer reproduzierbaren Entmarkung hauptsächlich im Bereich des corpus callosum. Nach Absetzen der Diät setzt eine spontane Remyelinisierung ein. Ab diesem Zeitpunkt sollten die Tiere mit verschiedenen Dosen Sst über unterschiedliche Zeiträume behandelt werden. Zur Beurteilung der Effekte von Sst auf die Remyelinisierung wurden folgende Kriterien herangezogen:

- LFB-PAS Färbung zur Detektion von Myelin
- Elektronenmikroskopische Darstellung axonaler Strukturen anhand von Ultradünnschnitten und Quantifizierung der De- und Remyelinisierung, Bestimmung der G-Ratio
- Immunhistochemie: NogoA Färbung – Anzahl von OL, Bielschowski- und APP-Färbung – Darstellung von Axonen und deren eventueller Schädigung, Mac-3-Färbung – Aktivierung von Mikroglia
- Quantitative Analyse von Myelinproteinen (MBP, PLP und CNP) über Western Blot

## II Material und Methoden

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden als Triplikate oder zumindest als Duplikate angefertigt.

### 1. Geräte und Chemikalien

Alle verwendeten Geräte und Chemikalien sind in den Tabellen 1-3 dargestellt.

**Tab. 1** Verwendete Geräte

Geräte	Firma bzw. Hersteller
HPLC	bai, Bensheim
Ultrazentrifuge L8-M SW 28 Rotor SW 41 Rotor SW 52 Rotor	Beckmann, USA
Mini-Twin-Gelelektrophoresekammer Trio Thermoblock (PC-Gerät)	Biometra, Göttingen
Mini-TransBlot Cell	Bio-Rad, München
Vakuum Zentrifuge Jota RVC	Christ, Göttingen
Coulter Counter	Coulter Electronics, Krefeld
Superspeed Zentrifuge Servall RC-5B Refrigerated	Du Pont Instruments, USA
Schüttler und Wasserbad	Gebr. Rettberg, Göttingen
Peristaltikpumpe	Ismatec SA Labortechnik, Zürich
Glashomogenisator	Heidolph, Deutschland
Luer-Lock Knopfkanüle, 1mm x 4cm	Heiland Med GmbH, Hamburg
Zentrifuge: Omega 70000 mit Rotor SW 30 Brutschrank Cypem Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Slap Gel Trockner Model SE 1160	Hoffer Scientific Instruments
pH-Meter	Knick, Deutschland
Autoradiogramm Kassette	Kodak Industrie, Paris (Frankreich)

Schüttler	Krannich, Göttingen
MACS-Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroplatten-Reader zur Cholesterinbestimmung	Molecular Devices
Nalgene Röhrchen Ultra Plus	Nalge Company Rochester (USA)
Gelkammern Elektrophorese Konstant Power ECPS 3000	Pharmacia (Schweden)
Sterilarbeitsbank	Process Techniques, Hannover
Edelstahlfiltrationsvorsatz (SM162 14) Sterilfilter (0,2µM Porengröße)	Sartorius, Göttingen
Kühlzentrifuge 2 KD mit Swing-out-Rotor	Sigma, München
Metallkanülen 12cm, Innendurchmesser 1mm Anatomische Pinzetten Präparierpinzetten Skalpellhalter und Rasierklingen Arterienklinge Magnetrührer Ultraschall Ultraschallbad	Schütt, Göttingen
Feinwaage Mettler	Spoerhase AG, Gießen
Shimadzu UV-160A-Spektralphotometer	Shimadzu Corporation, Kyoto (Japan)
Dampfsterilisator Typ 300	Varioklav, München
UV-Kontaktlampe Typ Chromen	Vetter GmbH, Wiesloch
Osmometer	Schlag, Bergisch Gladbach
Axioskop für Durchlicht und Auflichtfluoreszenz (Anxiovert 200) mit UV- Lampe, Temperaturkontrolle, Digitalkamera und Notebook IM 35 Phasenkontrastmikroskop Novascan 30 Elektronenmikroskop	Zeiss, Göttingen

**Tab. 2:** Verwendete Verbrauchsmaterialien und Reagenzien/Chemikalien

<b>Reagenz / Chemikalie</b>	<b>Firma bzw. Hersteller</b>
ECL Western Blotting Detection Reagents 1 und 2 ECL Plus Western Blotting Detection Reagents Hybond-ECL-Nitrocellulose-Membran Protein-A-Sepharose Beads PVDF-Membran Trockenmilch [ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]ATP	Amersham Buchler, Braunschweig
Methanol	Baker, Deventer (Niederlande)
Baypen Trasylol 100 000 KIE	Bayer, Leverkusen
DePeX Einschlussmittel „Gurr“ <sup>®</sup>	BDH Laboratory Supplies, England
Beckmann Ultra-Clear Tube 5x20mm, 5x41 mm, 14x89 mm	Beckman, Coulter, USA
Fötales Kälberserum (FCS) Ham's F-10 HEPES Leucin Methionin Minimal Essential Medium-Earle Minimal Essential Medium-Earle ohne Leucin und Methionin Penicillin/Streptomycin (10000 $\mu$ g/ml)	Biochrom KG, Berlin
Dithiothreitol (DTT) jetSI-Endo Transfektionsreagenz ML-7 N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Bradford Protein Assay Reagents DC Protein Assay Reagents	Bio Rad Laboratories GmbH, München

Nuc View™ 488 Caspase-3 Assay Kit zur Detektion apoptotischer Zellen	Biotium, Inc., Hayward (USA)
Rho-Kinase Assay Kit	Biozol, Eching
Geranylgeranyltransferaseinhibitor (GGTI) Sst Sst, Sodium Salt (aktivierte Form) Rho-Kinase-Inhibitor (Y27632)	Calbiochem Merck, Darmstadt
Rac/Cdc42 Activation Assay Kit	Cell Biolabs, San Diego (USA)
Ethanol (EtOH) 95% Isopropanol	Chemie-Vertrieb, Hannover
Isotone II Lösung	Coulter Diagnostics GmbH, Krefeld
Aquasol EN <sup>3</sup> HANCE™	DuPont, Boston (USA)
B-Mercaptoethanol D(+)-Glukose Monohydrat D(-)-Fruktose Nonidet-P40 (NP-40)	Fluka, Buchs (Schweiz)
RX Fuji Medical X-Ray Film	Fuji, Tokio
Protein DOT-Metric Assay-Kit	Geno-Tech, St Louis (USA)
Acrylamid	Gerbu, Gailberg
B27-Supplement Basal Medium Eagle (BME) Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) Minimal Medium	Gibco (Invitrogen), Leiden
Kulturschalen 35/10 mm (8,8cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Röntgenfilm Entwickler und Fixierer	Kodak Industrie, Paris
Amidoschwarz Ammoniumperoxidisulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (APS) Bromphenolblau Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O) Coomassie Brilliant Blue G-250 Dimethylsulfoxid (DMSO) Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt

Ethanol reinst	
Ethanol vergällt	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	
Essigsäure konz. (Eisessig)	
Fruktose	
Glukose	
Glycerin	
Glycin	
Harnstoff	
Kaliumchlorid (KCl)	
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	
Kaliumhydroxid (KOH)	
Lithiumchlorid ( $\text{LiCl}_2$ )	
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	
Mayers Häkalaun	
Natriumchlorid (NaCl)	
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	
Natriumhydroxid (NaOH)	
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	
Phosphorsäure	
Saccharose	
Salzsäure konz.	
Trichloressigsäure (TCA)	
Amplex Red Cholesterol Assay Kit	Molecular Probes (Invitrogen), Eugene, Oregon (USA), Leiden
Rhodamin Phalloidin	
Sterilfilter Millex 22 $\mu\text{M}$	Millipore, Cork (Irland)
SAPK/JNK Assay Kit (Nonradioactive)	New England Biolabs, Frankfurt
TC-Dish 35x10; 12-, 24-, 48-, 96-Lochplatten	Nunc, Roskilde (Dänemark)
FCS-GOLD	PAA, Cölbe
Percoll	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Agarose	



RhoG siRNA (h)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Zell Scraper 25cm	Sarstedt, Newton (USA)
Zelluloseacetat-Folie	Sartorius, Göttingen
595 ½ Faltenfilter 270mm	Schleicher&Schuell, Feldbach (Schweiz)
Nylonnetze (Porengrößen 300, 150 und 70 µm)	Schütt, Göttingen
Kupfergrits (Durchmesser 3,05 mm)	SCI Science Services, München
BSA, krist. reinst Ethylenglycolbis(2-aminoethylether)- N',N',N',N'-tetraessigsäure (EGTA) N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) Paraformaldehyd Triton X-100	Serva, Heidelberg
Adenosintriphosphat (ATP) Alkalische Phosphatase Aprotinin Avidin (Peroxidase-gekoppelt) BSA, krist. reinst Bis(cylohexanone)oxaldihydrzone (Cuprizone) Cholesterin-PEG 600 Cytosin-1-beta-D-Arabinofuranosid (Ara-C) DAB-Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin) Farnesylpyrophosphat (FPP) Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) Guanidinium-HCl Insulin Leucin Luminol sodium salt Methionin MTT (Thiazylol blue)	Sigma, Deisenhofen

Myelin Basic Protein (MBP) Natrium-Orthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) Natrium-Pyrophosphat Nerve-Growth-Factor (NGF) p-Coumarinsäure Polyethylenglycol 600 (PEG 600) Poly-D-Lysin Poly-L-Lysin Schiff's Reagenz Transferrin Tris Tween 20 Tween 40	
Mehlfutter Pelletfutter	Ssniff, Soest
Catch and Release v2.0 (Immunpräzipitations-Kit) Ras Aktivierungs Assay Kit Rho Aktivierungs Assay Kit	Upstate Biomol, Hamburg

Tab. 3 Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma bzw. Hersteller
ECL anti-Kaninchen IgG Horseradish (Peroxidase gekoppelt) ECL anti-Maus IgG Horseradish (Peroxidase gekoppelt) biotinylierter anti-Maus biotinylierter Esel-anti-Kaninchen biotinylierter Schaf-anti-Maus biotinylierter Ziege-anti-Ratte	Amersham Bioscience, England
Anti-Myelin Proteolipid Protein (Myelin PLP), polyklonale Ig Fraktion	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Anti-Pan-Ras (Ab-3), monoklonaler Maus	Calbiochem, Darmstadt

IgG	
Anti-Cdc42, monoklonaler Maus Antikörper Anti-Rac1, monoklonaler Maus Antikörper	Cell Biolabs, San Diego, USA
Anti-MOSP (Myelin-Oligodendrocyte-specific-Protein), monoklonaler Maus IgM Anti-APP, Klon 22C11, monoklonaler Maus-anti-Mensch	Chemicon, Hofheim
Anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), polyklonaler Kaninchen Ig Anti-MBP, polyklonaler Kaninchen IgM (für Paraffinschnitte)	DAKO GmbH, Hamburg
Fab Fragmente Ziege anti Maus	Dianova Jackson Immunoresearch, Suffolk, England
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgM Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus IgM Alexa Fluor 546 anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes (Invitrogen), Leiden
Anti-Akt, polyklonaler anti Kaninchen Anti-Phospho-Akt, monoklonaler Kaninchen IgG	New England Biolabs, Frankfurt
Anti Mac-3, Klon M3/84, monoklonaler Ratte-anti-Maus	Pharmingen, San Diego, USA
Anti-Elmo2 (M-551), polyklonaler Kaninchen IgG Anti-MBP (C-16), polyklonaler Kaninchen IgG (für Western Blot) Anti-p-MLC2(Ser19), polyklonaler Kaninchen IgG Anti-RhoA (26C4), monoklonaler Maus IgG Anti-RhoG (C-20), polyklonaler Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Anti-Rho GDI (A-20), polyklonaler Kaninchen IgG	
Anti-Rock2 (H-85), polyklonaler Kaninchen IgG	
Anti-Aktin, Kaninchen IgG	Sigma, Deisenhofen
Anti-CNPase, monoklonaler Maus IgG	

Der NogoA-Antikörper wurde von M.E. Schwab aus Zürich zur Verfügung gestellt (OERTLE et al., 2003). Der verwendete PLP Antikörper stammt von der Abteilung Neurogenetik (K.A. Nave) des MPI für experimentelle Medizin Göttingen. Anti-MOG wurde von Prof. Brück aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

## 2. Zellkultur

### 2.1 Lösungen und Medien

Alle Lösungen und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, sterilfiltriert.

#### Hexose-Phosphat (HP)-Puffer:

Fruktose                    5 % (w/v) (=277,5 mM)  
 Glukose                    5,5 % (w/v) (=277,5 mM)  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                    10 mM

in wässriger Lösung

pH 7,3 mit 1 N KOH einstellen

630 ± 15 mOsm

#### Transportpuffer:

200 ml HP-Puffer mit 400 U/ml Penicillin und 400 µg/ml Streptomycin

#### Fötale Kälberserum (FCS):

Für die Lagerung bei -20°C wurde das Serum bei 56°C für 30 min inaktiviert und portionsweise eingefroren. Vor dem Gebrauch wurde die jeweilige Portion sterilfiltriert.

Cytosin-1-beta-D-Arabinofuranosid (Ara-C)-freies Medium:

Minimal Essential Medium-Earle (MEM)	4,805 g
Ham's F10	4,945 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,7 g
Transferrin	10 mg
Insulin	5 mg
Mezlocillin (Baypen)	40 mg
HEPES	3,58 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

pH 7,3 mit 1 N KOH einstellen  
300 ± 10 mOsm

Cytosin-1-beta-D-Arabinofuranosid (Ara-C)-Medium:

wie Ara-C-freies Medium, Zugabe von 4 mg/l Cytosin-1-beta-D-Arabinofuranosid (Ara-C)

Kulturmedium:

Ara-C-Medium mit 5 % (v/v) FCS

Zu Beginn der Behandlung mit Sst (± Additiva) wurde das Kulturmedium gegen Ara-C-freies Medium mit 1 % (v/v) FCS-GOLD ausgetauscht.

Sst-Lösung:

Stammlösung: 10 mM in Ethanol

effektive Endkonzentration: 5 µM, falls nicht anders angegeben

Percoll:

Am Präparationstag frisch auf pH 7,3 mit 1 N HCl eingestellt (ca. 6 Tropfen auf 45 ml, filtriert).

Poly-D-Lysin:

Am Präparationstag wurden 2 mg/100 ml Poly-D-Lysin eingewogen und eine wässrige Lösung hergestellt. Für die Beschichtung der Kulturschalen wurde die Lösung filtriert.

## 2.2 Präparation von Schweine-OL

Die Präparation von Schweine-OL erfolgte nach der von GEBICKE-HÄRTER et al. (1984) in diesem Labor etablierten Methode. Als Ausgangsmaterial für die Präparation dienten Gehirne von 6 bis 8 Monate alten Hausschweinen (*Sus scrofa*), die von einem ortsansässigen Schlachtbetrieb (Schlachtereierdellmann, Reyershausen) sowie dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik Göttingen bezogen wurden. Nach Betäubung der Tiere mit der Elektrozanze erfolgte das Töten durch Öffnen der Halsschlagader. Auf das intensive Abflammen der Kopfregion wurde möglichst verzichtet, um eine Schädigung der Hirnzellen zu verhindern. Der Zeitraum zwischen dem Tod der Tiere und der Entnahme der Gehirne sollte 20 min nicht überschreiten. Die Lagerung der Hirne erfolgte in Transportpuffer bei 4°C (auf Eis). Die Präparation der Schweine-OL erfolgte unter sterilen Bedingungen auf Eis. Alle verwendeten Lösungen wurden ebenfalls auf Eis gelagert. Die Gehirne wurden aus dem Transportgefäß in eine Petrischale überführt und Reste des Rückenmarks sowie das Kleinhirn entfernt. Mit einem Skalpell wurden die Gehirnhälften in der Frontalebene in 2-3 mm dicke Scheiben geschnitten und in HP-Puffer aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Präparation der weißen Substanz unter Vermeidung des ventrikelauskleidenden Ependyms. Die weiße Substanz wurde in eine neue Petrischale mit HP-Puffer überführt, zweimal gewaschen und gewogen. An jedem Präparationstag wurden vier Hirnhälften weiße Substanz (2 x 14 g) präpariert und für jeden Dichtegradienten 12-14 g eingesetzt. Nach einer groben Zerkleinerung der Substanz mit einer Rasierklinge erfolgte die Zugabe von 15 ml HP-Puffer und die Aufnahme in einer 30 ml Einwegspritze. Für eine weitere Zerkleinerung wurde die Zellsuspension möglichst luftblasenfrei und mit geringem Druckaufwand durch zwischen zwei Einwegspritzen befindliche Edelstahlfiltrationsvorsätze gepresst. Diese waren mit Nylonnetzen der Maschenweiten 300, 150 und 70 µm bestückt, wobei das Durchpressen der Substanz nacheinander durch die Filter, beginnend mit der Maschenweite 300 µm, erfolgte. Nach dem letzten Durchpressen wurde die Substanz mit HP-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 30 ml aufgefüllt. Die Fraktionierung der Suspension erfolgte in einem diskontinuierlichen Drei-Stufen-Percoll-Dichtegradienten (in 30 ml Zentrifugenröhrchen):

1. 25 ml HP-Puffer + 5 ml Percoll (5:1, 10 ml je Röhrchen)
2. 30 ml Zellsuspension + 10 ml Percoll (3:1, 13 ml je Röhrchen)
3. 12 ml HP-Puffer + 6 ml Percoll (2 :1, 5 ml je Röhrchen)

Die Zentrifugation des Gradienten erfolgte für 30 min bei 10.000 rpm und 4°C in einem SW 28 Swing-out-Rotor. Nach der Zentrifugation wurde die Fraktion mit den OL, die sich direkt über den sedimentierenden Erythrozyten befand, entnommen und zweimal mit Ara-C-freiem Medium gewaschen. Dazu wurden die Zellen im ersten Schritt bei 500 x g und 4°C für 10 min pelletiert. Der zweite Waschschrift erfolgte bei 130 x g und 4°C ebenfalls für 10 min. Das Pellet wurde in Ara-C-Medium aufgenommen und die Zellzahl mithilfe eines Coulter Zell-Counters bestimmt. Die Zellzahl wurde auf  $5 \times 10^6$  Zellen / 2 ml Medium eingestellt.

### 2.3 Anlegen einer Monolayer-Zellkultur

Für das Anlegen einer Monolayer-Zellkultur wurden Zellkulturschalen (32 mm Durchmesser), 24-, und 48-Lochplatten für mindestens 30 min mit Poly-D-Lysin beschichtet und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Pro Schale wurden ca.  $5 \times 10^6$ , in einer 24-Lochplatte ca.  $1,25 \times 10^6$  und in einer 48-Lochplatte ca. 600.000 Zellen pro Schacht ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit (ALTHAUS et al., 1984; BÜRGISSER et al., 1988). Ca. 18-22 h nach Aussaat der Zellen wurde das Medium in den Schalen durch Ara-C-Medium mit 5 % (v/v) FCS ersetzt. Danach erfolgte der Mediumwechsel alle 3-4 Tage. In allen Experimenten, bei denen die Zellen Sst ausgesetzt wurden, oder aber auch Stimulationsexperimenten, erfolgte ein Austausch des Mediums gegen Ara-C-freies Medium, dem 1 % (v/v) FCS-GOLD zugesetzt wurde.

### 2.4 Präparation von Mäuse-OL

#### Präparation:

Die Präparation von Mäuse-OL erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Simons des MPI für experimentelle Medizin Göttingen. Für die Isolierung primärer Mäuse-OL wurden das Mittelhirn und die Hemisphären von Mausembryonen (Alter E15-17) entnommen und in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco/Invitrogen) bei 37°C abgelegt. Nach Inkubation in einer 0,5 %-igen Trypsin-EDTA-Lösung für 5-10 min bei 37°C wurde das Material zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 10 ml BME (Basal Medium Eagle, Gibco/Invitrogen, + 10 % (v/v) Pferdeserum + 1 % (w/v) Glutamat + 1 % (v/v) Pen/Strep; 37°C) versetzt. Die Zerkleinerung des Materials

erfolgte mit einer 10 ml Pipette (grob) und anschließend durch wiederholtes Aufziehen mit einer leicht verengten Glaspasteurpipette (fein). Danach konnte die Zellsuspension in vorbereitete Zellkulturflaschen verteilt werden (je 3-4 Hirne pro Flasche)

#### Vorbereitung der Zellkulturflaschen, Petrischalen und Deckgläser:

Deckgläser wurden ü.N. in 65 %-iger  $\text{HNO}_3$  inkubiert, anschließend dreimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gewaschen, für 5 min in Methanol geschwenkt und nach abschließendem dreimaligem Waschen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  einzeln getrocknet und sterilisiert. Die Zellkulturflaschen, Petrischalen und Deckgläser wurden mit einer 0,1 %-igen (w/v) PLL-Lösung (Poly-L-Lysin, Sigma) ü.N. bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank beschichtet. Zusätzlich wurden die Petrischalen und Deckgläser mit entsprechendem Kulturmedium versehen und im Brutschrank äquilibriert.

#### OL-Kultur:

Zwischen Tag 4 und Tag 6 nach Aussaat erfolgte der Neuronenkill (Neuronenantikörper AK 358 + Komplement 60 min auf die Zellen geben und dreimal mit Medium waschen). Am Tag 8 wurde das Medium zur Hälfte gewechselt. Das Entfernen der Makrophagen erfolgte am Tag 11 durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflaschenwand. Durch diesen Schritt wurden sie abgelöst, anschließend abgesaugt und die Kulturflasche mit neuem Medium aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde am Tag 14 wiederholt. Für die anschließende Abschüttelung der OL wurde die Kulturflasche in horizontaler Richtung 20 x kräftig geschüttelt, die Suspension in 50 ml Falcon-Tubes gegeben und zentrifugiert (10 min bei 900 rpm). Das Pellet wurde einmal gewaschen und im Anschluss die Zellen gezählt. Je nach weiterer Kulturbedingung wurden die Zellen in folgenden Dichten ausgesät:

150.000 – 200.000 Zellen je Deckglas mit 15 mm Durchmesser

500.000 – 600.000 Zellen je Deckglas mit 32 mm Durchmesser

200.000 Zellen je 12-Loch-Platte

Bei Zusatz von Sst wurde das Medium gegen Hippo-B27-Medium + 1 % (v/v) FCS-GOLD ausgetauscht.



Hippo-B27-Medium:

10 x MEM	10 ml
5,5 %-ige Bicarbonatlösung	4 ml
20 %-ige Glukoselösung	3 ml
1,1 %-ige Pyruvatlösung	1 ml
Penicillin / Streptomycin	1 ml
Glutamax	1 ml
B27-Supplement	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 100 ml

sterilfiltrieren

**2.5 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die unter verschiedenen Bedingungen behandelten OL wurden mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für 30 min fixiert und anschließend in 0,2 M Cacodylatpuffer gewaschen. Für die Nachfixierung wurden die Zellen für 1 h mit 1 % Osmiumtetroxid / 0,1 % Cacodylatpuffer behandelt. Nach der Dehydrierung und Trocknung wurde das Objekt mit Hilfe eines Sputter-Gerätes mit Gold-Palladium beschichtet. Die anschließende Betrachtung der Objekte erfolgte mit einem Zeiss Novascan 30 Rasterelektronenmikroskop.

Cacodylatpuffer (0,2 M Stammlösung):

Natriumcacodylat-trihydrat	20,15 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	250 ml

pH 7,4 mit HCl einstellen

**2.6 Lebendzellfärbung****2.6.1 MTT-Assay**

Dem MTT-Assay liegt eine enzymatische Reaktion zugrunde, bei der ein Substrat nur von lebenden Zellen umgewandelt werden kann (MOSMANN, 1983). Die in den Mitochondrien lokalisierte Succinatdehydrogenase metabolisiert den gelben, wasserlöslichen Farbstoff Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein violettes, wasserunlösliches Produkt (MTT-Formazan), das photometrisch erfasst werden kann.

MTT-Lösung:

5 mg/ml MTT in PBS lösen und sterilfiltrieren

Lysepuffer:

SDS	1 g
DMSO	9,4 ml
Eisessig	30 µl

Durchführung:

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die MTT-Lösung im Verhältnis 1:10 (200 µl/ 2 ml Medium) in die jeweilige Kulturschale zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30-60 min im Brutschrank, nach der im Phasenkontrastmikroskop bei lebenden Zellen die Bildung von schwarzen Kristallen deutlich sichtbar sein sollte. Die Zellen wurden mit einem Spatel von der Kulturschale abgekratzt und pelletiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer wurde die Suspension 10 min gerührt und die Extinktion des Lysats in einer 96-Loch-Platte bei 570 nm bestimmt.

## 2.7 Detektion apoptotischer Zellen im Caspase-Assay

Bei dem verwendeten Caspase-3 Assay (Nuc View™ der Firma Biotium, Inc.) wird ein DEVD Substrat, das weder fluoresziert noch als DNA-Farbstoff funktional ist, im Zytoplasma durch eine aktive Caspase-3 gespalten. Der freiwerdende DNA-Farbstoff wandert anschließend in den Zellkern, wo er ihn anfärbt. Diese Färbung ist als grüne Fluoreszenz mikroskopisch sichtbar. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## 3. Immunzytochemische Färbungen

### 3.1 Lösungen

Phosphate-buffered Saline (PBS):

NaCl	154 mM	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5 mM	
KCl	2,7 mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	in wässriger Lösung

Paraformaldehydlösung:

Für eine 3 %-ige Paraformaldehydlösung wurden 750 mg der Substanz in 3,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und 2 Tropfen 1 N NaOH erhitzt, bis das Paraformaldehyd vollständig gelöst war. Nach Abkühlen der Lösung wurden 3,5 ml 10x PBS zugegeben und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf ein Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt. Diese Fixierungslösung wurde bei Verwendung immer frisch angesetzt.

Methanol / Eisessig (-20°C):

Methanol      90 ml

Eisessig        10 ml

Antikörper-Verdünnungspuffer (AVP):

0,5 % (w/v) BSA in PBS (AVP-P) bzw. 0,5 % (w/v) BSA in Ara-C-freiem Medium (AVP-M)

### **3.2 MOSP- (Myelin-OL-spezifisches Protein) und MOG- (Myelin-OL-Glykoprotein) Färbung**

Die entsprechenden Kulturen wurden nach mindestens 8 DIV einmal in PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Maus anti-MOSP (1:5000 in AVP-M) bei RT für 30 min auf der Wippe. Nach Entfernen der Antikörperlösung wurden die Zellen dreimal mit Ara-C-freiem Medium gewaschen und in Methanol / Eisessig (95:5, v/v) für 15 min bei 4°C fixiert. Zur Detektion von MOSP im Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen anschließend mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488 IgM Maus, 1:1000 in AVP) für 30 min bei RT geschaukelt. Nach Entfernen der Antikörperlösung erfolgte ein abschließendes dreimaliges Waschen mit PBS.

Zur Darstellung von MOG wurde wie oben beschrieben verfahren, anstelle von MOSP wurde der von Prof. Brück (Institut für Neuropathologie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellte Anti-MOG verwendet.

### 3.3 GFAP- (Glial fibrillary acidic protein) Färbung

Die Inkubation mit Kaninchen anti-GFAP (1:1000 in AVP-M) erfolgte bei RT für 30 min auf der Wippe. Nach dreimaligem Waschen mit Ara-C-freiem Medium wurden die Zellen mit Methanol / Eisessig für 15 min bei 4°C fixiert. Nach Entfernen der Fixierungslösung und dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, Rhodamin gekoppelten Antikörper (Alexa Fluor 546 IgG Kaninchen, 1:1000 in AVP) für 30 min bei RT auf der Wippe. Abschließend wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Die Kopplung der sekundären Antikörper zur Detektion von MOSP und GFAP mit unterschiedlichen Farbstoffen (FITC für MOSP bzw. Rhodamin für GFAP) ermöglichte die Doppelfärbung innerhalb einer Kulturschale. Dabei wurde zunächst die MOSP-Färbung (s. II.3.2) vorgenommen. Bei der anschließenden GFAP-Färbung erfolgte nach der Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper und anschließendem Waschen mit PBS direkt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper.

### 3.4 Aktinfärbung

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst mit 3 %-iger Paraformaldehydlösung für 10 min bei RT auf der Wippe fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit einer 0,1 %-igen Triton X-100 Lösung in PBS für 3-5 min bei RT. Anschließend konnte Aktin durch Zugabe der in AVP-P verdünnten Rhodamin-Phalloidin-Stammlösung (1:200) angefärbt werden (30 min bei RT auf der Wippe). Nach Entfernen der Färbelösung und dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die mikroskopische Auswertung. Dies musste zügig geschehen, da die Fluoreszenzintensität relativ rasch zurückging.

## 4. HPLC

Für die Auftrennung von Sst-Lacton und Hydroxy-Sst über RP-HPLC wurde eine Superspher-RP-18 mit einer Partikelgröße von 4 µm verwendet.

#### Laufmittel:

Puffer A: Acetonitril – Ammoniumacetat (1:9, v/v)

Puffer B: Acetonitril – Ammoniumacetat (9:1, v/v)

Die Elution erfolgte isokratisch mit 15 % Puffer A und 85 % Puffer B. Zwischen jedem Lauf wurde die Säule mit einer 1 %-igen Ethanollösung gespült. Für die Bestimmung der Elutionszeit wurden Lösungen der beiden Standards (Sst-Lacton und Hydroxy-Sst, je 0,1 mg/ml) hergestellt und je 2,5 µl auf die Säule gegeben. Die jeweilige Retentionszeit wurde durch einen am Säulenende angeschlossenen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 238 nm (Absorptionsmaximum beider Standards) erfasst. Um das eventuelle Auftreten von Zwischenprodukten mit einem anderen Absorptionsmaximum zu erfassen wurde als zweite Wellenlänge 210 nm gewählt. An den UV-Detektor war für die spätere Auswertung ein Schreiber angeschlossen.

Zur Darstellung der Umwandlung von Sst-Lacton zu Hydroxy-Sst wurde die Stammlösung der inaktiven Form (Sst-Lacton, 10 mg/ml in Ethanol) auf 0,1 mg/ml in PBS verdünnt. Dieser Ansatz (300 µl) wurde bei 37°C inkubiert und nach festgelegten Zeiten jeweils ein Aliquot (5 µl) entnommen, das zur späteren Analyse eingefroren oder direkt auf die Säule gegeben wurde. Eine quantitative Erfassung der Umwandlung zu Hydroxy-Sst erfolgte über die Flächenberechnung der Peaks.

## **5. Proteinbiochemische Methoden**

### **5.1 Herstellung des Zelllysats**

#### **5.1.1 Proteaseinhibitoren**

Für die Detektion von Proteinen im Western Blot wurden bei Herstellung des Zelllysats die folgenden Proteaseinhibitoren zugegeben:

##### PMSF (100 mM):

17,4 mg PMSF in 1 ml Isopropanol bei RT lösen  
Endkonzentration 1 mM, immer frisch angesetzt

##### NaF (100 mM):

4,2 mg NaF in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bei RT lösen  
Endkonzentration 1 mM, immer frisch angesetzt

##### Aprotinin (1 mg/ml):

1 mg Aprotinin in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> Bei RT lösen, Lagerung portionsweise bei -20°C

Endkonzentration 1 µg/ml

Leupeptin (1 mg/ml):

1 mg Leupeptin in 1ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bei RT lösen, Lagerung portionsweise bei -20°C

Endkonzentration 1 µg/ml

Natriumorthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM):

92 mg Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> in 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bei RT lösen

Vor der Verwendung musste Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> aktiviert werden. Der Ausgangs – pH-Wert der Lösung lag bei ~12. Mit 1 N HCl wurde ein pH-Wert von 10 eingestellt, wodurch sich die Lösung gelb färbte. Durch kurzes Aufkochen wurde die Lösung wieder farblos. Nach Abkühlen auf RT wurde der pH-Wert mit 1 N HCl oder 1 N NaOH wieder auf 10 eingestellt und die Lösung erneut aufgekocht. Diese Schritte wurden wiederholt, bis nach Aufkochen und Abkühlen der Lösung der pH-Wert bei 10,0 konstant blieb. Anschließend konnte die Natriumorthovanadat-Lösung portionsweise bei -20°C eingefroren werden.

Endkonzentration 1 mM

### **5.1.2 Zellernte**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Kulturschalen zunächst auf Eis mit PBS (+ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) gewaschen und anschließend die Zellen mit einem Zell-Scraper von der Kulturschale gelöst. Nach Zentrifugation bei 500 x g und 4°C für 5-10 min konnte überschüssiger Waschpuffer abgesaugt werden.

### **5.1.3 Trennung Zytosol- und Membranfraktion**

Zur Trennung der oligodendroglialen Membranfraktion von der zytosolischen Fraktion wurden die geernteten und in PBS gewaschenen Zellen in 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (4 x 5 s). Durch Zentrifugation bei 100.000 x g und 4°C für 45 min konnten die Fraktionen voneinander getrennt werden. Der Überstand (= zytosolische Fraktion) wurde abgenommen, unter N<sub>2</sub> eingengt, und anschließend ebenso wie das Pellet (= Membranfraktion) in 2 %-iger SDS-Lösung aufgenommen und mit einem Magneten gerührt.

10 mM Tris-HCl-Puffer:

121,14 mg Tris in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen

pH 7,4 mit 1 N HCl einstellen

2 %-ige SDS-Lösung:

2 g SDS in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen

**5.1.4 Detektion von GTP-gebundenem p21Ras, RhoA, Rac1 und Cdc42**

Nach der Ernte wurden die Zellen in folgendem Puffer lysiert:

HEPES	298 mg (25 mM)	pH 7,4 mit 1 N NaOH einstellen
NaCl	438 mg (150 mM)	
NP-40	500 µl (1 %)	
Na-deoxycholat	125 mg (0,25 %)	
MgCl <sub>2</sub>	102 mg (10 mM)	
EDTA	18,6 mg (1 mM)	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 50 ml	

Nach einer 15 minütigen Rotation des Lysats bei 4°C wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt und die Werte entsprechend mit Lysepuffer angeglichen. Die Gesamt-Endvolumina sollten dabei identisch sein. Zur Bestimmung der GTP-gebundenen Form der kleinen G-Proteine wurden Pull-Down-Assays genutzt. Das Prinzip beruhte darauf, dass die Bindedomäne des jeweiligen Effektors, welche die GTP-gebundene Form der GTPase erkennt, als Fusionsprotein an Glutathion-Agarose-Beads gekoppelt war (Raf-1 RBD Agarose für p21Ras, Rhotekin RBD Agarose für RhoA, PAK1 PBD Agarose für Rac1 und Cdc42). Entsprechend der Angaben der Hersteller wurden die Lysate mit einer definierten Menge Agarosebeads unter Rotation bei 4°C inkubiert (für p21Ras ü.N., für RhoA, Rac1 und Cdc42 3 h). Nach Zentrifugation der Agarose-Beads wurden diese dreimal mit Lysepuffer gewaschen und anschließend in 2x Probenpuffer resuspendiert, was die Dissoziation des Proteins von der Agarose bewirkte. Das Anfertigen von Positiv- und Negativkontrollen erfolgte nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers. Vor dem Auftragen der Probe wurde diese für

5 min gekocht. Der Nachweis der Proteine erfolgte nach Auftrennung im SDS-Gel über Western Blot.

### 5.1.5 Interaktion von RhoA mit RhoGDI

Für die Darstellung der Interaktion von RhoA mit RhoGDI wurde das Zelllysats (bei mehreren Proben jeweils gleiche Proteinmengen) mit ProteinA-Sepharose-Beads sowie dem RhoGDI-Antikörper für 3 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Beads durch kurze Zentrifugation pelletiert und 3x mit Lysepuffer gewaschen. Nach Resuspendieren der Beads mit 2x Probenpuffer und Kochen für 5 min wurden die Proben in einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis von RhoA erfolgte nach Transfer auf die PVDF-Membran im Western-Blot. Die Detektion von RhoA bei dieser Methode zeigte nur den Anteil, der an RhoGDI gekoppelt war.

#### Lysepuffer:

Tris	20 mM (242,28 mg)	pH 7,4 mit 1N HCl einstellen
NaCl	137 mM (800,6 mg)	
SDS	0,1 % (w/v, 100 mg)	
Na-deoxycholat	0,5 % (w/v, 500 mg)	
Triton X-100	1 % (v/v, 1 ml)	
EDTA	2 mM (74,448 mg)	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 100 ml	

### 5.1.6 Interaktion von RhoG mit Elmo2 zur Bestimmung des Anteils von GTP-gekoppeltem RhoG

Für einen Nachweis der Aktivierung von RhoG wurde die Interaktion mit Elmo2, einem spezifischen Adaptorprotein von RhoG, das nur die GTP-gekoppelte Form bindet, untersucht. Die Herstellung des Zelllysats erfolgte wie unter II.5.1.4. Nach dem Angleich der Proteinmengen durch Lysepuffer wurden gleiche Mengen mit ProteinA-Sepharose und dem RhoG-Antikörper für 3 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Beads durch kurze Zentrifugation pelletiert und 3x mit Lysepuffer gewaschen. Das Ablösen der an die Beads gekoppelten Proteine erfolgte durch resuspendieren in 2x Probenpuffer. Nach dem Aufkochen wurden von jeder Probe 20 µl auf einem 12 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Im anschließenden Western-Blot



wurde als Primärantikörper Elmo2 verwendet, um das an RhoG-GTP gekoppelte Elmo2 nachzuweisen. Der Vergleich von Sst behandelten OL zu einer Kontrolle konnte daher Aufschluss über eine Änderung der Aktivität von RhoG infolge einer Sst-Behandlung geben.

### 5.1.7 SDS – Zellysate

Für die Aufarbeitung des Gesamtzellproteins für die SDS-PAGE wurden die Zellen nach der Ernte für 20 min in 2 %-iger SDS-Lösung (w/v) + Proteaseinhibitoren bei RT gerührt und lysiert.

## 5.2 Proteinbestimmung

### 5.2.1 Bradfordtest

Für den quantitativen Nachweis von Proteinen in einer detergenzfreien Lösung wurde der „Protein-Assay-Kit“ von Bio-Rad verwendet, der auf der kolorimetrischen Methode von Bradford (BRADFORD, 1976) basiert. Proteine und Peptide mit einer Molekularmasse von > 3 kDa bilden mit dem in saurer Lösung anionisch vorliegenden Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 einen blauen Farbstoff, der photometrisch gemessen werden kann. Die untere Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei 1 µg.

Mit der nach Angaben des Herstellers angefertigten Färbelösung wurde zunächst eine Eichgerade mit BSA im Bereich von 1-10 µg Protein / Ansatz erstellt. Die Proteinlösung wurde dazu mit 200 µl Färbelösung versetzt, der Ansatz gemischt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm in einem Mikroplatten-Reader abzüglich eines Leerwertes ohne Protein gemessen. Die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe konnte nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Protein [mg/ml]} = \text{OD}_{595} \times m / V$$

m = Steigung der Eichgeraden

V = Probevolumen [µl]

### 5.2.2 Tüpfelprobe

Für die Erstellung einer Eichgerade bei der Tüpfelprobe nach NEUHOFF et al., 1979 wurden BSA-Lösungen im Bereich von 0,5-5 mg/ml hergestellt (in NaCl-Lösung). Von jedem Ansatz wurden 2 µl auf ein Stück Zelluloseacetat-Folie getüpfelt und in einer Amidoschwarz-Färbelösung, die Proteine gleichzeitig färbt und fixiert, für 5 min bei RT inkubiert. Überflüssiger Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit einer Entfärbelösung entfernt (3 x 10 min bei RT auf der Wippe). In gleicher Weise konnte man mit den zu bestimmenden Proben verfahren. Die Proteinwertbestimmung erfolgte durch visuellen Vergleich mit der Eichgerade.

#### NaCl-Lösung:

0,9 % NaCl (w/v) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

#### Amidoschwarz-Färbelösung:

0,5 % Amidoschwarz (w/v) in Methanol / Eisessig (Verhältnis 9:1)

#### Entfärbelösung:

Methanol / Eisessig im Verhältnis 9:1

### 5.2.3 DC – Protein-Assay

Das auf dem Prinzip von Lowry (LOWRY et al., 1951) beruhende Proteinassay der Firma Bio-Rad kann ebenso wie die Tüpfelmethode zur Bestimmung des Proteinwertes detergentzhaltiger Zelllysate genutzt werden. Zunächst findet eine Reaktion des Proteins mit Kupfer in alkalischem Medium statt. Die so modifizierten Proteine können in einer zweiten Reaktion zugegebenes Folin reduzieren. Dadurch entsteht ein blauer Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 750 nm, das photometrisch erfasst werden kann (PETERSON et al., 1979). Der Vorteil gegenüber der klassischen Methode nach Lowry ist, dass 90 % der Farbentwicklung innerhalb der ersten 15 min der Inkubation entstehen und dieser Wert innerhalb einer Stunde mit einer Abweichung von 5 % konstant bleibt. Für die Erstellung einer Eichgerade wurden BSA-Lösungen mit einer Proteinkonzentration zwischen 0,2 mg/ml und 1,42 mg/ml erstellt. 3 µl jeder Lösung wurden in den Schacht einer 96-Lochplatte pipettiert. Von den im Assay mitgelieferten Lösungen wurden pro Ansatz 1 µl Reagenz S mit 25 µl Reagenz A gemischt und zu der

Proteinlösung gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Reagenz B und Mischen des Ansatzes erfolgte eine Inkubation für 15 min bei RT, bevor die Extinktion in einem Bereich von 650-750 nm gemessen werden konnte. Die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe konnte nach der unten aufgeführten Formel bestimmt werden. Dabei war jedoch zu beachten, dass das Probevolumen den Volumina der eingesetzten Standardansätze zur Bestimmung der Eichgerade identisch sein musste. Die Eichgerade wurde bei jeder Messung unbekannter Proben parallel angefertigt.

$$\text{Protein [mg/ml]} = \text{OD}_{650} \times m$$

m = Steigung der Eichgeraden

### 5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### Acrylamid (AA)-Stammlösung:

Acrylamid 30 % (w/v)

N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) 0,8 % (w/v)

In wässriger Lösung, mit Aktivkohle mindestens eine Stunde rühren und anschließend filtrieren.

#### Tris/HCl-Puffer pH 8,8 (Puffer B):

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 in wässriger Lösung

#### Tris/HCl-Puffer pH 6,8 (Puffer D):

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 in wässriger Lösung

#### Ammoniumperoxidsulfat-Stammlösung (APS):

10 % (w/v) APS in wässriger Lösung

#### SDS-Stammlösung

10 % (w/v) SDS in wässriger Lösung

#### Trenngel:

Abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins wurden Gele mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad, d.h. unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen, hergestellt. Proteine mit einem hohen Molekulargewicht wurden auf niedrigprozentigen,

Proteine mit niedrigem Molekulargewicht auf hochprozentigen Gelen aufgetrennt (Tab.4).

**Tab. 4** Zusammensetzung der Trenngele verschiedener Konzentrationen

<b>Trenngel</b>	<b>5 %</b>	<b>6 %</b>	<b>7,5 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>15 %</b>
<b>AA-Stammlösung</b>	1 ml	1,2 ml	1,5 ml	2 ml	2,4 ml	3 ml
<b>B-Puffer</b>	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<b>SDS-Stammlösung</b>	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub></b>	3,44 ml	3,24 ml	2,94 ml	2,44 ml	2,04 ml	1,44 ml
<b>TEMED</b>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<b>APS-Stammlösung</b>	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Sammelgel:

AA-Stammlösung	0,99 ml
D-Puffer	1,5 ml
10 %-ige SDS-Lösung	60 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	3,45 ml
APS-Stammlösung	50 µl
TEMED	10 µl

Probenpuffer (1x):

8 %-ige SDS-Lösung	1 ml
Glycerin	1 ml
D-Puffer	2 ml
β-Mercaptoethanol	80 µl
Bromphenolblau	100 µg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 4 ml

Probenpuffer (3x):

Tris	0,114 g (62,5 mM)
------	-------------------

---

SDS	0,3 g
Glycerin	1,5 ml
DTT	0,116 g
Bromphenolblau	100 µg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 4 ml

pH 6,8 mit 1 N HCl einstellen

#### Laufpuffer:

Tris	30 g (49,5 mM)
Glycin	144 g (383,6 mM)
SDS	5 g (3,5 mM)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 5 l

pH 8,6

#### Herstellen der Gele:

Ein 1 mm dickes Trenngel wurde zwischen zwei durch Spacer getrennte Glasplatten, die durch eine Gummidichtung und drei Klammern zusammengehalten wurden, gegossen und mit 0,1 %-iger SDS-Lösung überschichtet. Nach einer Polymerisationsdauer von mindestens 20 min und Entfernen der überschichteten SDS-Lösung wurde das Sammelgel eingefüllt. Zur Taschenbildung wurde ein Kamm in das Sammelgel eingeführt. Anschließend erfolgte eine weitere Polymerisationsdauer von 20 min.

#### Probenvorbereitung:

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer gemischt (1:1) und anschließend, falls nicht anders angegeben, für 2 min bei 95°C denaturiert.

#### Elektrophorese:

Das Gel wurde in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und der Kamm vorsichtig entfernt. Um überflüssige Gelreste zu entfernen, wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült und mit den Proben beladen. Für das Einwandern der Proben in das Sammelgel wurde zunächst eine Stromstärke von 10-15 mA / Gel angelegt. Nach etwa 10 min wurde der Gellauf bei 25 mA / Gel fortgesetzt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Für die Detektion aller im Gel aufgetrennten Proteine wurde es nach der Elektrophorese angefärbt. Für den spezifischen Nachweis eines bestimmten Proteins im Western Blot wurden die Proteine im Anschluss an die Elektrophorese auf eine Nitrozellulose- (oder PVDF-) Membran übertragen.

#### 5.4 Coomassie-Färbung von Proteinen

Nach Beenden der Elektrophorese wurden die SDS-Gele für 30-60 min bei RT auf der Wippe inkubiert. Nach Spülen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  wurde das Gel in Entfärbelösung ü.N. bei RT geschwenkt. Zum Aufsaugen des überflüssigen Farbstoffes wurden Schwammstücke auf die Entfärbelösung gelegt.

Für eine Konservierung der SDS-Gele wurden diese luftblasenfrei zwischen zwei befeuchtete Dialysierfolien gelegt und mit Hilfe eines Gel-Dryers unter Vakuum getrocknet.

##### Färbelösung:

Coomassie Brillant Blue 250	0,01 % (w/v)
Essigsäure	7,5 % (v/v)
Methanol	50 % (v/v)
in wässriger Lösung	

##### Entfärbelösung:

Essigsäure	1,5 % (v/v)
Methanol	5 % (v/v)
Glycerin	5 % (v/v)
in wässriger Lösung	

#### 5.5 Western-Blot

Für die Übertragung der in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurde das Verfahren des Tankblotting angewendet (TOWBIEN et al., 1979, BURNETTE, 1981). Dazu wurden Gel und Blotfolie luftblasenfrei zwischen Filterpapieren und Schwammtüchern in Gitterkassetten geklemmt und in den mit Blot-Puffer gefüllten Tank eingehängt. Ein ebenfalls in den Tank eingehängter Eis-Akku sorgte für die

Kühlung des Systems. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA für 1 h. Erfolgte die Immundetektion nicht direkt im Anschluss, konnte die Nitrozellulosemembran bei -20°C und die PVDF-Membran bei 4°C gelagert werden.

### **Lösungen und Puffer:**

#### Verbrauchsmaterialien:

Hybond<sup>TM</sup>-ECL-Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 45 µm

Hybond<sup>P</sup>-ECL-PVDF-Membran mit einer Porengröße von 45 µm

#### Blot-Puffer:

Glycin	14,4 g (192 mM)
Tris	3,03 g (25 mM)
10 %-ige SDS-Lösung	4 ml
Methanol	200 ml (20 %, v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l

#### PBS-Tween-20 (Waschlösung):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,4 g (80 mM)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g (20 mM)
NaCl	11,68 g (0,1 M)
Tween-20	1 ml (0,1 %, v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 2 l

#### TBS-Tween-20 (abgewandelte Waschlösung, besonders zur Detektion phosphorylierter Proteine):

Tris	10 mM	pH 7,4 mit 1 N HCl einstellen
NaCl	150 mM	
Tween-20	0,05 % (v/v)	

In wässriger Lösung

Blockierungslösung:

5 % (w/v) Trockenmilch in PBS- (TBS-) Tween-20

**Blockierung und Antikörperinkubation:**

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C in Blockierungslösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dazu wurde eine Antikörperlösung mit der entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers in Blockierungslösung hergestellt und zusammen mit der Membran in Folie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C unter Schwenken. Nach Entfernen der Lösung wurde die Membran einmal für 15 min und zweimal für 5 min in PBS- (TBS-) Tween-20 gewaschen. Im folgenden Schritt wurde an den Primärantikörper ein Horseradish-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper gebunden. Dafür wurde eine Antikörperlösung (falls nicht anders angegeben in der Verdünnung 1:2000) in Blockierungslösung hergestellt, zusammen mit der Membran in Folie eingeschweißt und für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran einmal für 15 min und viermal für 5 min in PBS- (TBS-) Tween-20 gewaschen.

**Immundetektion:**Verbrauchsmaterial:

RX Fuji Medical X-ray Film

Detektionslösung 1+2 (Amersham)

Der Röntgenfilm wurde nach der Exposition im Entwicklerbad für ca. 3 min entwickelt und nach Abspülen im Wasserbad in Fixiererlösung für ca. 10 min fixiert. Nach erneutem Waschen im Wasserbad wurde der Film zum Trocknen aufgehängt. Die Größenordnung der sichtbaren Banden erfolgte durch Übertragen der auf der Membran sichtbaren Banden des Molekularmarkers auf den Röntgenfilm.

Da die ECL-Exponierungszeiten für den Röntgenfilm in Abhängigkeit der Antikörper variierten, mussten sie für jeden Antikörper neu bestimmt werden. Ein zu starkes oder zu schwaches Signal konnte durch Variation der Verdünnung der Antikörper oder Variation der ECL-Exponierungszeiten kompensiert werden. Trat ein zu hoher Hintergrund auf, wurde der Sekundärantikörper höher verdünnt.



Wenn infolge der Sst-Behandlung eine Verschiebung zwischen membrangebundenen und zytosolischen G-Proteinen stattfand, wurden, bei deren Nachweis, zur Hervorhebung des jeweils schwächeren Anteils die Exponierungszeiten für Membran bzw. Zytosol variiert. Eine Berechnung der Verhältnisse von membrangebundenem zu zytosolischem Anteil des jeweiligen Proteins konnte aber nur bei gleicher Exponierungszeit erfolgen.

### **Quantifizierung der Banden des Röntgenfilms**

Für eine vergleichende Analyse der im Western Blot entstandenen Banden wurde das Programm „Scion Image für Windows“ angewendet, mit dem eine Messung der Bandenintensität vorgenommen werden konnte. Für eine genaue Quantifizierung der Banden wurde auch die Intensität des jeweiligen Hintergrundes bestimmt und von den zu vergleichenden Intensitätswerten abgezogen.

## **6. MAPK-In-Gel-Kinase-Assay**

### **Lösungen:**

#### Lösung 1:

Tris	3,03 g (50 mM)
Isopropanol	100 ml (20 %, v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 500 ml

Mit 1 N HCl auf pH 8,0 einstellen

#### Lösung 2:

Tris	3,03 g (50 mM)
β-Mercaptoethanol	175 µl (5 mM)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 500 ml

Mit 1 N HCl auf pH 8,0 einstellen

Lösung 3:

Tris	1,21 g (50 mM)
$\beta$ -Mercaptoethanol	70 $\mu$ l (5 mM)
Guanidinium-HCl	114,64 g (6 M)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 200 ml

Mit 1 N HCl auf pH 8,0 einstellen

Lösung 4:

Tris	9,09 g (5 mM)
$\beta$ -Mercaptoethanol	525 $\mu$ l (5 mM)
Tween-40	60 $\mu$ l (0,04 %, v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1,5 l

Mit 1 N HCl auf pH 8,0 einstellen

Lösung 5:

TCA	100 g (5 %, w/v)
Na-Pyrophosphat	20 g (1 %, w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 2 l

Reaktionspuffer:

Tris	0,606 g (50 mM)
MgCl <sub>2</sub>	0,102 g (5 mM)
EDTA	0,038 g (1 mM)
DTT	0,077 g (5 mM)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 100 ml

Mit 1 N HCl auf pH 8,0 einstellen

„Heißer“ Reaktionspuffer:

Reaktionspuffer	10 ml
ATP	10 $\mu$ l einer 50 mM Lösung (2,8 mg ATP in 100 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> lösen)
[ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]-ATP	50-60 $\mu$ Ci (6-7 $\mu$ l)

MBP-Trenngel:

H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	1,84 ml
MBP	600 µl (3 mg MBP in 600 µl Puffer B lösen)
Puffer B	1,5 ml
AA-Stammlösung	2 ml
10 %-ige SDS-Lösung	60 µl
APS	30 µl
TEMED	5 µl

Sammelgel:

s. II.5.3

Mit Hilfe dieses Assays konnte eine Aktivierung der MAPK ERK1/2 nachgewiesen werden. Bei vorhandener Aktivität der Kinasen wird radioaktiv markiertes Phosphat in das Substrat MBP eingebaut, was sich über einen Röntgenfilm nachweisen lässt. Nach Aufarbeitung der Proben wurden etwa 10 µg Protein / Geltasche aufgetragen.

Basierend auf dem Protokoll von KAMESHITA und FUJISAWA (1989) wurde im Anschluss an die Gelelektrophorese das SDS aus dem Gel entfernt und die MAPK de- bzw. renaturiert. Der Nachweis von renaturierten MAPK-Aktivitäten erfolgte, leicht modifiziert, nach einem Protokoll von VIRDEE und TOLKOVSKY (1995). Der Ablauf lässt sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) SDS-Entfernung: Gel 2 x 60 min in je 250 ml Lösung 1 bei RT schwenken
- 2) Äquilibration: Gel 2 x 60 min in je 250 ml Lösung 2 bei RT schwenken
- 3) Denaturierung: Gel 2 x 60 min in je 100 ml Lösung 3 bei RT schwenken
- 4) Renaturierung: Gel 6 x 60 min in je 250 ml Lösung 4 bei 4°C schwenken, auch über Nacht möglich

Danach wurde das Gel für 45 min in 20 ml Reaktionspuffer auf Eis äquilibriert. Die Inkubation in 10 ml „heißem“ Reaktionspuffer erfolgte bei 30°C für 60 min. Um überschüssige Radioaktivität zu entfernen, wurde das Gel 5 x 60 min in je 500 ml Lösung 5 bei RT gewaschen. Anschließend wurde das Gel zwischen angefeuchtete Dialysierfolie gelegt und im Gel-Dryer getrocknet. Das getrocknete Gel wurde in einer Kassette befestigt und ein Röntgenfilm eingelegt, der bei -70°C für mindestens drei Tage exponiert wurde.

## 7. SAPK/JNK Assay Kit

Der Nachweis einer Aktivierung der SAPK/JNK erfolgte nach dem Protokoll des nichtradioaktiven Assay-Kits der Firma Cell Signaling. Mit Hilfe des mitgelieferten Lysepuffers wurde ein Zelllysats hergestellt und die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben angeglichen. Im Anschluss erfolgte unter Rotation bei 4°C eine Inkubation des Zelllysats mit Agarose-Beads, an die c-JUN als Fusionsprotein gekoppelt war. Da c-JUN ein Substrat der SAPK/JNK darstellt, konnte über eine anschließende Zentrifugation der Beads die an das Substrat gebundene Kinase vom Zelllysats getrennt werden. Unter Zugabe von Kinasepuffer sowie ATP konnte die SAPK/JNK in der folgenden Inkubation bei 30°C das Substrat c-Jun phosphorylieren. Durch Zugabe von Probenpuffer wurde die Reaktion abgestoppt, die Probe gekocht und in einem 12 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Über einen spezifischen Phospho-c-Jun Antikörper konnte im anschließenden Western Blot eine Aktivität der SAPK/JNK nachgewiesen werden.

## 8. Rho-Kinase Assay

RhoA kann in der GTP-gebundenen Form die Rho-Kinasen ROCK 1 und 2 aktivieren. Die Bestimmung der Aktivität von ROCK erfolgte nach dem Protokoll des Rho-Kinase Aktivitätsassay-Kits der Firma Biozol. Eine im Kit enthaltene 96-Lochplatte war dabei mit einem Substrat beschichtet, das dem C-Terminus der rekombinanten Myosin-Bindestelle (MBS) der Myosin Phosphatase entspricht. Der darin enthaltene Threoninrest wird von ROCK in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und ATP phosphoryliert und kann dann von einem spezifischen Antikörper (AF20) erkannt werden. Dieser HRP-gekoppelte Antikörper wandelt das im Anschluss zugegebene Chromogen-Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) um, wodurch sich die ursprünglich farblose Lösung zunächst blau, und nach Zugabe der Stopplösung gelb färbt. Die Färbung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm erfasst werden.

## 9. Myelinextraktion

Die Extraktion von Myelin aus Schweinehirn erfolgte nach dem Protokoll von NORTON (1974). Dafür wurden 3 g weiße Hirnsubstanz präpariert, zunächst in 30 ml einer 0,32 M Saccharoselösung mit Hilfe eines Glashomogenisators zerkleinert und das

Gesamtvolumen letztlich auf 60 ml erhöht. Anschließend wurden drei 30 ml Tubes mit je 10 ml einer 0,85 M Saccharoselösung gefüllt und je 21 ml der Hirnsubstanzlösung darüber geschichtet. In der darauf folgenden Zentrifugation bei 23.000 rpm (70000 g) und 4°C in einem SW-28-Rotor entstand eine Interphase, die mit einer Spritze aufgenommen und in ein neues Tube gegeben wurde. Nach Auffüllen der Tubes mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 23.000 rpm und 4°C für 15 min. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in einer geringen Menge H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> dispergiert, das Tube mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgefüllt und bei 10.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Im Anschluss wurde das Pellet in 40 ml der 0,32 M Saccharoselösung gelöst, erneut homogenisiert und auf ein Gesamtvolumen von 65 ml aufgefüllt. Für den folgenden Gradienten wurden erneut in 3 Tubes je 10 ml 0,85 M Saccharoselösung gefüllt, 21 ml des Homogenisats darüber geschichtet und bei 27.000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Die entstandene Interphase wurde mit einer Spritze abgenommen, in ein neues Tube überführt, mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgefüllt und für 15 min bei 23.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> dispergiert, das Tube mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgefüllt und bei 10000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei die Zentrifugation bei 23.000 rpm und 4°C für 15 min stattfand. Nach Entfernen des Überstandes konnte das Pellet getrocknet und bei -20°C eingefroren werden.

Zur Kontrolle der Reinheit der isolierten Myelinproteine wurde 1 mg des getrockneten Pellets in 200 µl 2 %-iger SDS-Lösung aufgenommen und gerührt, mit 200 µl Probenpuffer versetzt und anschließend gekocht. Die Proteine wurden in einem 12 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend über eine Coomassie-Färbung (s.II.5.4) sichtbar gemacht.

#### 0,32 M Saccharoselösung:

10,954 g Saccharose, H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 100 ml

#### 0,85 M Saccharoselösung:

29,095 g Saccharose, H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 100 ml

## 10. Nachweis neu synthetisierter Proteine durch Einbau von L-[U-<sup>14</sup>C]-Leucin

### Lösungen:

#### Ara-C-freies Medium ohne Leucin und Methionin (MEM o. Leu/Met):

MEM ohne Leucin/Methionin	9,55 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,7 g
Transferrin	10 mg
Insulin	5 mg
Mezlocillin (Baypen)	40 mg
HEPES	3,58 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
pH 7,3 mit 1 N KOH einstellen	
300 mOsm ± 10	

#### Leucin-Stammlösung:

2 mM (0,262 mg/ml) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, Endkonzentration 20 µM

#### Methionin-Stammlösung:

2 mM (0,298 mg/ml) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, Endkonzentration 20 µM

#### L-[U-<sup>14</sup>C]-Leucin:

11,2 GBq/mmol, 50 µCi/ml, Endkonzentration 0,75 µCi pro 2 ml Kulturmedium

### Methodik:

#### Zellbehandlung:

Die Zellkulturen (32 mm Kulturschalen) wurden nach 6-7 DIV in Ara-C-Medium + 5 % (v/v) FCS einem Mediumwechsel zu Ara-C-freiem Medium (MEM o. Leu/Met, Zusatz von 20 µM Leucin und 20 µM Methionin) + 1 % (v/v) FCS-GOLD unterzogen und für 24, 48, 72 und 96 h mit 5µM Sst behandelt. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von <sup>14</sup>C-Leucin zu den Kulturen. Am Ende der Behandlung wurden die Zellen gerntet, das Pellet in 300 µl 1 %-iger SDS-Lösung aufgenommen und 1 h mit einem Magneten

gerührt. Nach Bestimmung der Radioaktivitäten und Proteinwerte wurde ein für zwei SDS-Gele ausreichendes Aliquot der Proben mit Probenpuffer versetzt und aufgekocht.

#### Quantitative Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität und Proteinbestimmung:

Je 2 µl der Probe wurden mit 400 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 10 ml Aquasol<sup>®</sup> (universeller Liquid Counter Cocktail für die Messung der Radioaktivität aquatischer Proben) versetzt. Die enthaltenen Radioaktivitätswerte wurden mittels eines LKB Liquid Scintillation Counters bestimmt. Gleichzeitig wurden die Proteinwerte nach der DC-Methode (s.II.5.2.3) bestimmt.

#### Autoradiogramm der radioaktiven Proben:

Für den Nachweis der inkorporierten Radioaktivität im Autoradiogramm wurden zwei 12 %-ige SDS-Gele angefertigt. Im ersten Gel wurden gleiche Proteinmengen und im zweiten die jeweils gleiche Menge nachgewiesener Radioaktivität aufgetragen. Gleichzeitig wurde als Referenz eine Probe des unter II.9. aufgereinigten Myelins aufgetragen. Im Anschluss an den Trennlauf wurde das Gel für 1 h in 30 % Methanol / 10 % Eisessig (v/v in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) fixiert. Nach einer weiteren Stunde in eiskaltem EN<sup>3</sup>HANCE<sup>™</sup> (Enhancer für die Autoradiographie, zur Verkürzung der Exponierdauer) wurden die Gele in eiskaltem Wasser für eine Stunde gewaschen. Die beiden letzten Schritte wurden schwenkend auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die Gele getrocknet und ein Autoradiogramm auf einem RX Fuji Medical X-ray Film angefertigt. Der Film wurde bei -70°C für mindestens 10 Tage exponiert. Anhand der Referenz konnten die entstehenden Banden den Myelinproteinen zugeordnet werden.

## **11. Cholesterinbestimmung**

### Methodik:

Für die Cholesterinbestimmung wurde das Amplex<sup>®</sup> Red Cholesterol Assay Kit der Firma Molecular Probes verwendet. Das Assay basiert auf einer enzymatischen Reaktion, bei der freies Cholesterin und Cholesterin-Ester detektiert werden können. Cholesterin-Ester werden durch die Cholesterin-Esterase zu Cholesterin hydrolysiert, das im nächsten Schritt durch die Cholesterin-Oxidase zu dem korrespondierenden Ketonprodukt und Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Mit der Amplex Red Reagenz (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) wird das entstandene Wasserstoffperoxid detektiert,

indem es in Anwesenheit einer Horseradish-Peroxidase (HRP) mit der Amplex Red Reagenz in einer 1:1 Stöchiometrie zu einem stark fluoreszierenden Resorufin umgewandelt wird. Das Absorptions- und Fluoreszenz-Emissions-Maximum liegt zwischen 560 und 590 nm und konnte mit einem Mikroplatten-Reader bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Cholesterinwerte wurde mit einer Cholesterin-Referenz (2 mg/ml) eine Eichgerade im Bereich 0-20 µg/ml Cholesterin erstellt.

Die geernteten Zellen, deren Cholesterinwert bestimmt werden sollte, wurden in 100 µl Reaktionspuffer durch Ultraschallbehandlung auf Eis lysiert. 50 µl der Probe wurden anschließend mit 50 µl Working-Solution in einer 96-Lochplatte gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion zwischen 560 und 590 nm gegen einen entsprechenden Leerwert (50 µl Reaktionspuffer + 50 µl Working-Solution) gemessen. Anhand der Eichgerade konnte die gemessene Extinktion einer Cholesterinkonzentration zugeordnet werden. Für die Berechnung der absoluten Werte war jedoch die Verdünnung der eingesetzten Probe zu beachten. Um Schwankungen der Werte, die auf eine unterschiedliche Zelldichte der Kulturschalen zurückzuführen sind, zu vermeiden und Vergleiche zwischen Proben zu machen, wurden gleichzeitig die Proteinwerte nach der Bradford-Methode (5.2.1) bestimmt und die Cholesterinwerte auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen (µg Cholesterin / mg Protein).

#### Immunzytochemische Detektion der Aufnahme von Cholesterin:

Um nachzuweisen, dass primäre OL in der Lage sind, exogenes Cholesterin aufzunehmen, wurde fluoreszierendes Cholesterin (Fluorescein-gekoppeltes Polyethylenglycol-50 (FPEG-Cholesterin)), zur Verfügung gestellt von Kobayashi) in einer Endkonzentration von 1 µM (ISHITSUKA et al., 2005) für 24 h auf OL-Kulturen gegeben. Die Cholesterinaufnahme konnte anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

## **12. Transfektion**

In OL konnte unter Verwendung des Transfektionsreagenz jetSI-Endo eine hohe Transfektionseffizienz erzielt werden (SCHMITZ, 2006). Dabei wird die zu



transfizierende Substanz in positiv geladene Partikel verpackt, die anschließend mit der Membran interagieren und über Endozytose aufgenommen werden können.

### **12.1 Transfektion mit RhoG-siRNA**

Für die Transfektion wurden zunächst 8 µl Transfektionsreagenz in 200 µl Gibco Minimal Medium gegeben, 5 min bei RT inkubiert und mit RhoG siRNA (8 µl einer 10 µM Lösung) vermischt. Zwecks membrangängiger Komplexbildung wurde dieser Ansatz für 15-20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Diese wurden zunächst mit MEM gewaschen und anschließend mit 1 ml MEM überschichtet (2,3 cm Kulturschale). Zusammen mit dem Transfektionsansatz erfolgte eine Inkubation der Zellen für 6 h oder ü.N. bei 37°C im Brutschrank. Danach wurde das Medium vollständig entfernt und gegen neues Medium (MEM + 5 % FCS) ausgetauscht.

### **12.2 Transfektion mit FPP**

Um den kompensatorischen Effekt von FPP auf die Behandlung mit Sst zu untersuchen, wurde das schlecht membrangängige FPP durch Transfektion in die Zelle eingeschleust. Die Prozedur erfolgte analog zu II.12.1. An Stelle von RhoG-siRNA wurden dem Ansatz jedoch 9 µl der FPP-Stammlösung (Endkonzentration 10 µM) zugegeben. Außerdem wurde das Medium nach der Transfektion gegen MEM + 1 % FCS-GOLD ausgetauscht. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte ebenfalls die Zugabe von Sst (5 µM).

## **13. In vivo Untersuchungen**

Alle in vivo Versuche wurden in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen durchgeführt.

### **13.1 Versuchstiere und Versuchsablauf**

Für das in vivo Projekt, das in Kooperation mit der Neuropathologie der Universität Göttingen durchgeführt wurde, standen für die erste Versuchsreihe 104 und für die zweite Versuchsreihe 48 weibliche C57BL/6N Mäuse (Charles River) zur Verfügung. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in 6-er Boxen im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin Göttingen. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der

Lieferung 28 d alt. Das Gewicht wurde von diesem Zeitpunkt an regelmäßig bestimmt. In dieser Zeit erhielten die Tiere normales Pelletfutter. Nach einer Gewöhnungsphase von 1-2 Wochen und einem Gewicht von je 15-17 g konnte mit den Versuchen begonnen werden.

### 13.1.1 Versuchsreihe 1

104 weibliche C57BL/6N Mäuse wurden in 16 Gruppen zu je 6 Tieren und 2 Gruppen zu je 4 Tieren eingeteilt (Tab. 5). 16 der 6-er Gruppen (1-16) wurden für 6 Wochen mit einer 0,02 %-igen (w/v) Cuprizin-Diät gefüttert und das Gewicht der Tiere einmal pro Woche kontrolliert. Die Behandlung mit Cuprizin führt zu einer reproduzierbaren Demyelinisierung hauptsächlich im Bereich des corpus callosum. Wird die Diät abgesetzt, beginnen die Tiere mit einer spontanen Remyelinisierung. Nach Absetzen von Cuprizin wurden die Mäuse wieder mit normalem Pelletfutter gefüttert. Zu diesem Zeitpunkt startete die tägliche Behandlung mit Sst (0, 1, 10 und 50 mg/kg b.wt.) für verschiedene Zeiträume (1-4 Wochen). Zur Kontrolle der Entmarkung wurde eine Gruppe (17) direkt nach Absetzen der Cuprizin-Diät getötet. Eine weitere Gruppe (18) erhielt weder Cuprizin noch Sst und diente als Grundlage für die Bewertung der Bemerkung gesunder Tiere („age-matched“ Kontrollen). Das Töten der Tiere dieser Gruppe erfolgte zusammen mit den Gruppen 13-16 am Ende der Versuchsreihe.

**Tab. 5:** Gruppeneinteilung C57BL/6N Versuchsreihe 1

Gruppe	Cupri-zon	Kon-trollen	1 mg Sst/ kg b.wt.	10 mg Sst/ kg b.wt.	50 mg Sst/ kg b.wt.	Dauer der Applikation
1	x	x				1 Woche
2	x		x			
3	x			x		
4	x				x	
5	x	x				2 Wochen
6	x		x			
7	x			x		
8	x				x	
9	x	x				3 Wochen

<b>10</b>	x		x			
<b>11</b>	x			x		
<b>12</b>	x				x	
<b>13</b>	x	x				4 Wochen
<b>14</b>	x		x			
<b>15</b>	x			x		
<b>16</b>	x				x	
<b>17</b>	x	Kontrolle der Entmarkung, töten nach Absetzen von Cuprizon				
<b>18</b>	„Age-matched“ Kontrollen					

#### 0,02 %-ige Cuprizon-Diät:

2 g Bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone (Cuprizon) zu 1 kg Pulverfutter geben und kräftig mischen

Das Futtermischung wurde jede Woche neu angesetzt und bei 4°C gelagert. In jeden Käfig wurde ein Keramiknapf mit je 30-40 g des Gemisches gestellt und das Futter alle 3-4 Tage gewechselt.

#### Sst-Suspension:

Basierend auf dem Protokoll von KIRSCH et al. (2003) wurden aus dem wasserunlöslichen Sst 0,2 %-ige (w/v) Agarosesuspensionen (in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) verschiedener Konzentrationen hergestellt:

- 1) 0,05 mg / ml Sst-Suspension für 1 mg/kg b.wt.
- 2) 0,5 mg /ml Sst-Suspension für 10 mg/kg b.wt.
- 3) 2,5 mg/ ml Sst-Suspension für 50 mg/kg b.wt.

Die Agarose wurde dazu aufgeköcht und nach Abkühlen mit der entsprechenden Menge Sst vermischt. Je nach Gewicht der Tiere betrug das applizierte Volumen 300-500 µl. Das Durchschnittsgewicht jeder Gruppe wurde einmal pro Woche bestimmt und das zu applizierende Volumen darauf eingestellt.

Die entsprechende Sst-Suspension wurde in eine 1 ml Spritze aufgenommen und über eine aufgesteckte Schlundsonde direkt in den Magen der Tiere appliziert. Kontrolltiere erhielten ein dem Gewicht entsprechendes Volumen einer 0,2 %-igen (w/v) Agaroselösung. Die Applikation erfolgte täglich für verschiedene Zeiträume.

### 13.1.2 Versuchsreihe 2

48 weibliche C57BL/6N Mäuse wurden in 8 Gruppen zu je 6 Tieren eingeteilt (Tab. 6). Sieben der 6-er Gruppen (1-4) wurden für 6 Wochen mit einer 0,02 %-igen Cuprizon-Diät gefüttert und das Gewicht der Tiere einmal pro Woche kontrolliert. Nach Absetzen der Diät wurden die Mäuse wieder mit normalem Pelletfutter gefüttert. Zu diesem Zeitpunkt startete die tägliche Behandlung mit Sst (0, 10 und 50 mg/kg b.wt., Sst-Suspension s. II.13.1.1) für verschiedene Zeiträume (3 und 6 Wochen). Zur Kontrolle der Entmarkung wurde eine Gruppe (5) nach Absetzen der Cuprizon-Diät getötet. Eine weitere Gruppe (6) erhielt weder Cuprizon noch Sst und diente als Grundlage für die Bemerkung gesunder Tiere („age-matched“-Kontrolle). Das Töten der Tiere dieser Gruppe erfolgte zusammen mit den Gruppen 13-16 am Ende der Versuchsreihe.

Tab. 6: Gruppeneinteilung C57BL/6N Versuchsreihe 2

Gruppe	Cupri- zon	Kontrollen	10 mg Sst/kg b.wt.	50 mg Sst/kg b.wt.	Dauer der Applikation
1	x	x			3 Wochen
2	x		x		
3	x			x	
4	x	x			6 Wochen
5	x		x		
6	x			x	
7	x	Kontrolle der Entmarkung, töten nach Absetzen von Cuprizon			
8	„Age-matched“ Kontrollen				

## 13.2 Präparation der Tiere

### 13.2.1 Perfusion zur Gewebefixation

Um eine Schädigung des Hirngewebes zu verhindern, wurden die Mäuse mit einem Fixativ perfundiert. Die Tiere wurden dazu durch subkutane Injektion mit 300 µl einer 14 %-igen (w/v in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) Chloralhydratlösung betäubt, auf Styropor fixiert und durch Öffnen des Brustkorbes das Herz freipräpariert. In den linken Ventrikel wurde eine Kanüle eingeführt, die mit einem Schlauch über eine Pumpe mit dem Vorratsbehälter für PBS bzw. Fixativ verbunden war. Nach Öffnen des rechten

Vorhofes wurde der Kreislauf der Tiere über die Peristaltikpumpe (Ismatec SA, Flussrate 0,2 – 0,5 ml / min) zunächst mit 50 ml PBS und anschließend mit 50-100 ml Fixativ perfundiert. Für Paraffineinbettungen diente 4 % (w/v in PBS) Paraformaldehyd als Fixativ, während für die Einbettung in Araldit zur elektronenmikroskopischen Auswertung eine 4 %-ige (w/v in PBS) Glutaraldehydlösung verwendet wurde. Nach der Perfusion wurde der Kopf der Tiere freipräpariert und in dem jeweiligen Fixativ für 24 h nachfixiert. Das Fixativ wurde anschließend gegen PBS ausgetauscht und nach weiteren 24-48 h das Hirn freipräpariert.

Für die Lichtmikroskopie wurden von den in Paraformaldehyd fixierten Hirnen Querschnitte angelegt. Von den in Glutaraldehyd fixierten Hirnen wurden für elektronenmikroskopische Auswertungen Längsschnitte angelegt.

### **13.2.2 Präparation von Hirngewebe für die Biochemie**

Für die Präparation von frischem Hirn wurden die Tiere zunächst durch subkutane Injektion mit 300 µl einer 14 %-igen (w/v) Chloralhydratlösung betäubt. Anschließend wurde der Kopf abgetrennt und das Hirn zügig und möglichst ohne Schädigung des Gewebes freipräpariert. Das Gehirn wurde auf eine Paraffinplatte gelegt und mit einer Rasierklinge der zu untersuchende Teil herausgeschnitten. Dafür wurde das Hirn einmal an der Übergangsstelle zum Kleinhirn quer durchtrennt. Der andere Schnitt wurde in Höhe der Stelle gesetzt, an der sich die Sehnerven vereinigen. Von dem verbleibenden Hirnstück wurde jeweils lateral sowie basal die graue Substanz bis zum Übergang zu den Ausläufern der Strukturen des corpus callosum entfernt. Das so erhaltene quaderförmige Hirnstück wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

## **13.3 Aufarbeitung des Hirngewebes**

### **13.3.1 Aufarbeitung für die Lichtmikroskopie**

#### **13.3.1.1 Einbettung und Schneiden**

Das fixierte Hirn wurde mit einer Rasierklinge quer in Scheiben geschnitten. Der erste Schnitt wurde an der Stelle gesetzt, an der die beiden Sehnerven sich vereinigen. Die folgende Scheibe sollte eine Dicke von ~1 mm haben. Die Scheiben wurden zunächst in

kleinen Plastiksieben für 2-3 h gewässert. Danach wurden die Blöcke nach folgendem Schema entwässert und eingebettet:

50 % Isopropylalkohol	3 h
70 % Isopropylalkohol	3 h
90 % Isopropylalkohol	3 x 3 h
100 % Isopropylalkohol	3 x 3 h
Xylol	2 x 3 h
Paraplast	2 x 3 h

Einbettung in frischem Paraplast

Entwässerung und Einbettung dauerten in der Regel 36 h. Nach Durchkühlen der Paraffinblöcke wurden mit einem Ultramikrotom Schnitte mit einer Dicke von ~0,5 µm angefertigt. Zur vorübergehenden Aufbewahrung wurden diese einzeln in eine mit kaltem Wasser gefüllte Glaspetrischale überführt. Zur Glättung der Schnitte wurden sie in eine mit warmem Wasser gefüllte Petrischale überführt und auf Objektträger aufgebracht. Zur besseren Anhaftung der Schnitte wurden die Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet. Anschließend konnten die Objektträger mit den aufgebrauchten Schnitten im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet werden.

### 13.3.1.2 LFB-PAS-Färbung zur Darstellung von Myelin

Die Paraffinschnitte wurden zunächst dreimal für je 3 min in Xylol, 2 min in Iso-Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol, 100 % - 100 % - 90 %, je 2 min) entparaffiniert. Nach einer Inkubation in Luxol-Fast-Blue-Lösung für 24h bei 60°C erfolgte die Differenzierung in einer 0,05 %-igen Lithiumcarbonatlösung, 70 %-igem Alkohol und schließlich H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Diese Differenzierungsschritte wurden bis zum Erreichen des optimalen Färbeergebnisses wiederholt. Für die anschließende PAS-Färbung wurden die Objektträger für 5 min in 1 %-iger Perjodsäure inkubiert. Die Färbelösung wurde durch gründliches Waschen unter fließendem Leitungswasser und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> entfernt. Danach folgte die Inkubation mit Schiff's Reagenz für 30 min. Nach Abspülen der Lösung mit Leitungswasser wurden die Objektträger für 2 min in Mayers Hämalaun inkubiert und nach Abspülen der Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> kurz in 1 % HCl-Alkohol differenziert. Anschließend erfolgte das Bläuen der Schnitte für 10 min in Leitungswasser. Zur Dehydrierung wurden die Objektträger in eine aufsteigende

Alkoholreihe ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ , 50 % - 70 % - 90 % -100 %) jeweils kurz eingetaucht bevor sie für 3 min in Xylol inkubiert wurden. Zur Konservierung der Schnitte wurden diese mit DePeX Einschlussmittel „Gurr<sup>®</sup>“ eingedeckt.

### 13.3.1.3 Axonfärbung – Versilberung nach Bielschowsky

Nach dem Entparaffinieren (s. II.13.3.1.2) wurden die Schnitte für 20 min in einer frisch angesetzten 20 %-igen Silbernitratlösung inkubiert. Nach Spülen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  wurde tropfenweise 25 %-ige Ammoniaklösung zugegeben und gut geschüttelt, bis der entstandene Niederschlag verschwunden war. Im Anschluss wurden zwei weitere Tropfen Ammoniak zugefügt und die Schnitte darin für 15 min im Dunkeln inkubiert. In einer neuen Küvette wurde  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  mit 3 Tropfen Ammoniak versetzt und die Schnitte darin geschwenkt. In die Küvette mit der Ammoniak-Silber-Lösung wurden 3 Tropfen Entwicklerlösung gegeben und gut geschüttelt. Die Schnitte wurden in diese Küvette gestellt und 1-3 min entwickelt, bis sie eine tabakbraune Farbe bekamen und die Fasern bei mikroskopischer Betrachtung schwarz erschienen. Nach Waschen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  erfolgte die Inkubation in 2 %-iger Natrium-Thiosulfat-Lösung. Im Anschluss erfolgte nach erneutem Waschen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und das Eindecken der Schnitte (s. II.13.3.1.2).

### 13.3.1.4 NogoA-Färbung

Mit Anti-NogoA können OL markiert werden. Der primäre Mausantikörper (11C7) wurde von M. E. Schwab (Zürich) zur Verfügung gestellt (OERTLE et al., 2003).

Nach der Entparaffinierung (s. II.13.3.1.2) wurden die Schnitte zunächst mit Citratpuffer (10 mM, pH 6) vorbehandelt. Dazu wurden die Objektträger in eine Küvette mit Citratpuffer gestellt und in der Mikrowelle 5 x für 3 min gekocht. Verdampfte Flüssigkeit wurde zwischen jedem Schritt durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  aufgefüllt. Zum Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 20 min in 3 %-iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (in PBS) im Kühlschrank inkubiert. Nach Spülen mit PBS erfolgte die Inkubation mit Ziege-anti-Maus Fab-Fragmenten (1:100 in PBS) für 1 h bei RT. Ungebundene Fragmente wurden im Anschluss durch Waschen mit PBS entfernt. Das Blockieren erfolgte in einer 10 %-igen FCS-Lösung (in PBS) für 1 h ebenfalls bei RT. Nach Abklopfen der FCS-Lösung erfolgte die Kopplung des primären NogoA-Antikörpers (1:20000 in FCS-PBS) ü.N. im Kühlschrank. Die Inkubation mit

dem sekundären biotinylierten Maus-Antikörper erfolgte für 1 h bei RT. Für die Darstellung des detektierten Antigens wurde die Strept(Avidin)-Biotin-Methode verwendet. An den antigenspezifischen Primärantikörper wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper gebunden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Peroxidasegekoppeltem Avidin, das eine hohe Affinität zu Biotin besitzt. Die Sichtbarmachung erfolgte mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), das durch die Peroxidase zu einem braunen Endprodukt oxidiert wird. Die Bindung von Peroxidase-gekoppeltem Avidin erfolgte für 1 h bei RT (1:1000 in FCS-PBS). Nach anschließendem Spülen erfolgte die Farbreaktion durch Zugabe der Chromogen-Substrat-Lösung (DAB) für etwa 5 min. Durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  wurde die Reaktion abgestoppt.

#### **13.3.1.5 Mac-3-Färbung**

Aktivierte Mikrogliazellen lassen sich in Paraffinschnitten mit Anti-Mac3 darstellen. Die gesamte Prozedur bis hin zur Farbreaktion erfolgte analog 13.3.1.4. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Ratte-anti-Maus Mac-3 (1:200 in FCS-PBS) verwendet, an den im nächsten Schritt der biotinylierte Ziege-anti-Ratte Sekundärantikörper (1:200 in FCS-PBS) gekoppelt wurde.

#### **13.3.1.6 APP-Färbung**

Die Detektion des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) gilt als Nachweis einer axonalen Schädigung. APP wird infolge eines schnellen axonalen Transports befördert und lässt sich so immunzytochemisch nicht darstellen. Kommt es zu einer Schädigung des Transports, so akkumuliert APP an der Stelle des Schadens und lässt sich immunzytochemisch nachweisen (FERGUSON et al., 1997) Die Färbung bis einschließlich der Farbreaktion erfolgte analog II.13.3.1.4. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Maus-anti-Human APP in einer Verdünnung von 1:2000 (in FCS-PBS) eingesetzt. Der Schaf-anti-Maus Sekundärantikörper wurde 1:200 (in FCS-PBS) eingesetzt.



### 13.3.2 Aufarbeitung für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

#### 13.3.2.1 Einbettung und Schneiden

Das mit Glutaraldehyd fixierte und präparierte Gehirn wurde nach dem folgenden Schema nachfixiert, dehydriert und eingebettet:

##### Nachfixieren:

1 % Osmiumtetroxid (2 % OsO<sub>4</sub> (w/v) + PBS zu gleichen Teilen) 1h im Kühlschrank  
 Auswaschen in Tris-Puffer 2 x 5 min

##### Dehydrieren:

50 % (v/v) Ethanol 1 x 10 min  
 0,5 % Uranylacetat ((w/v) in 70 % (v/v)Ethanol) 1 h im Kühlschrank  
 80 % (v/v) Ethanol 10 min  
 96 % (v/v) Ethanol 10 min  
 100 % Ethanol 2 x 15 min  
 Propylenoxid 2 x 20 min

##### Einbettung:

Araldit + Propylenoxid (1:1) 35 min  
 Araldit + Propylenoxid (2:1) 35 min  
 Araldit 1 h, davon 40 min im  
 Brutschrank bei 40°C

Anschließend wurden die vorgetrockneten Kapseln oder Flachförmchen mit frischem Araldit gefüllt, die Gewebestückchen eingelegt und mindestens 48 h bei 60°C getrocknet. Für die Anfertigung von Ultradünnschnitten wurde die Schnittfläche, die in Form eines Trapezes gebracht wurde, auf ca. 1mm<sup>2</sup> getrimmt. Mit der kurzen Seite nach oben wurde der Block eingespannt und mit einem Diamantenmesser Schnitte mit einer Dicke von 800-1000 Å angefertigt. Diese wurden auf Kupfergrits aufgezogen und luftgetrocknet. Durch Auftropfen von Bleicitrat, 8-minütiger Einwirkzeit und anschließendem Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> erfolgte die Kontrastierung.

### 13.3.3 Herstellung von Hirnlysaten für den Western Blot

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Hirne wurden auf Eis aufgetaut und das Gewicht bestimmt. Pro mg Gewebe wurden  $5\ \mu\text{l}$   $10\ \text{mM}$  Tris-HCl-Puffer (s. II.5.1.3) und alle Proteaseinhibitoren (s. II.5.1.1) zugegeben. Das Gewebe wurde im Glashomogenisator zerkleinert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Für eine weitere Zerkleinerung und das Aufschließen des Materials wurden die Homogenisate  $4\ \times$  für  $5\ \text{s}$  auf Eis mit Ultraschall behandelt. Je nach Ausgangsvolumen wurde eine definierte Menge entnommen und  $\frac{1}{4}$  des Volumens einer  $10\ \%$ -igen (w/v) SDS-Lösung zugegeben, sodass die SDS-Endkonzentration  $2\ \%$  betrug. Nach Zugabe eines Magneten wurden die Ansätze für  $20\ \text{min}$  auf Eis gerührt und für  $10\ \text{min}$  bei RT stehen gelassen. Nach Zentrifugation bei  $14\ 000\ \text{rpm}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für  $25\ \text{min}$  wurde der Überstand abgenommen und aliquotiert. Ein Aliquot wurde sofort weiterverwendet, die übrigen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem DC-Assay (s. II.5.2.3) bestimmt. Je nach Proteinwert wurden die Proben mit einem entsprechenden Volumen  $10\ \text{mM}$  Tris-HCl + SDS + Proteaseinhibitoren verdünnt, im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und aufgeköcht. Für die Darstellung der Myelinproteine im Western-Blot (s. II.5.5) wurden SDS-Gele verschiedener Konzentrationen angefertigt und für jedes nachzuweisende Myelinprotein eine definierte Proteinmenge aufgetragen (MBP- $1\ \mu\text{g}$ , PLP- $5\ \mu\text{g}$ , CNP- $20\ \mu\text{g}$ ). Nach Übertragung der Proteine auf die Membran konnten durch Einsatz spezifischer MBP-, PLP- und CNP-Antikörper die jeweiligen Myelinproteine detektiert werden. Aufgrund der Probenzahl mussten für jedes Myelinprotein mehrere Blots angefertigt werden; für eine spätere Quantifizierung der Bandenintensitäten des Röntgenfilms war daher zu beachten, dass die Blots gleichzeitig ECL-exponiert wurden.

## 13.4 Bewertung der Schnitte und Western Blots

### 13.4.1 LFB-PAS-Färbung

Die LFB-PAS Färbungen wurden mit dem Lichtmikroskop betrachtet und analysiert. Zur Bewertung der (Re)Myelinisierung und Demyelinisierung wurden die beiden lateralen Bereiche des corpus callosum betrachtet und der Grad der Demyelinisierung dieser Bereiche über einen Score bestimmt. Der Score 3 steht für eine komplette (Re)Myelinisierung, wie sie in „age-matched“ Tieren zu finden ist, und ein Score 0 für

eine vollständige Demyelinisierung. Ein Score von 1 steht für 0-1/3 Myelinisierung, ein Score von 2 für 1/3 – 2/3 Myelinisierung. Der Score wurde von 3 Personen unabhängig voneinander bestimmt.

#### **13.4.2 NogoA-, Mac-3- und APP-Färbung**

Die gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch betrachtet. Positive gefärbte Zellen wurden bei geeigneter Vergrößerung (1.000-2.000fach) gezählt und die Fläche des betrachteten Areals mit Hilfe des Programms „analySIS Docu<sup>®</sup> System“ (Soft Imaging System GmbH, Deutschland) berechnet. Für den Vergleich verschiedener Tiere und Behandlungen wurde die Anzahl positiver Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe bestimmt.

#### **13.4.3 TEM**

Von jedem Schnitt wurde elektronenmikroskopisch ein Feld ausgesucht und in 4.000facher Vergrößerung ein Übersichtsbild gemacht. Dieses Feld wurde anschließend in 20.000-facher Vergrößerung in 35-50 Einzelfotos abfotografiert. Von jedem zweiten Foto wurden mit Hilfe des Programms „analySIS Docu<sup>®</sup> System“ (Soft Imaging System GmbH, Deutschland) der Axondurchmesser und der Durchmesser der dazugehörigen Markscheide bestimmt. Pro Tier wurden so ca. 800-1000 Axone und die jeweils dazugehörige Markscheide vermessen. Bewertungskriterien für die TEM-Schnitte waren die Dicke der Markscheiden, das Verhältnis von unbemerktem zu bemerktem Axon (G-ratio) und das Verhältnis der myelinisierten zur demyelinisierten Fraktion (MERKLER et al., 2005).

#### **13.4.4 Scion-Image**

Die auf den Western Blots sichtbaren Proteinbanden der Myelinproteine MBP, PLP und CNP wurden mit dem Programm „Scion Image“ quantifiziert. In den ersten drei Durchgängen wurden jeweils gleiche Proteinmengen im SDS-Gel aufgetrennt. Die dazugehörigen verschiedenen Behandlungen der Tiere konnten so direkt nach der Quantifizierung der Banden des Western-Blots verglichen werden. In den folgenden drei Durchgängen wurden jeweils gleiche Volumina jeder Probe im SDS-Gel aufgetrennt. Neben dem Nachweis der Myelinproteine wurde der Aktgehalt mit einem spezifischen Antikörper im Western-Blot bestimmt. Unter Annahme einer

unveränderten Aktinexpression wurde der quantifizierte Myelinproteinwert zum quantifizierten Aktinwert ins Verhältnis gesetzt. Danach konnte ebenfalls der Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen erfolgen.

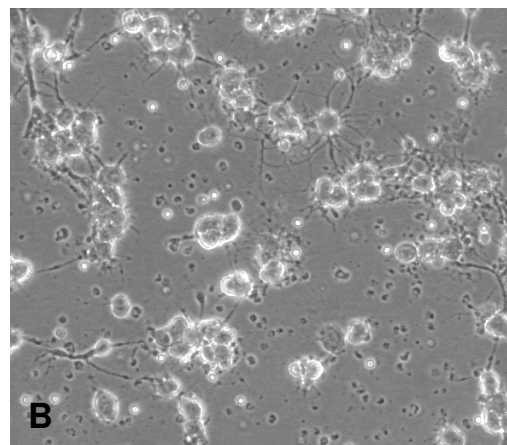
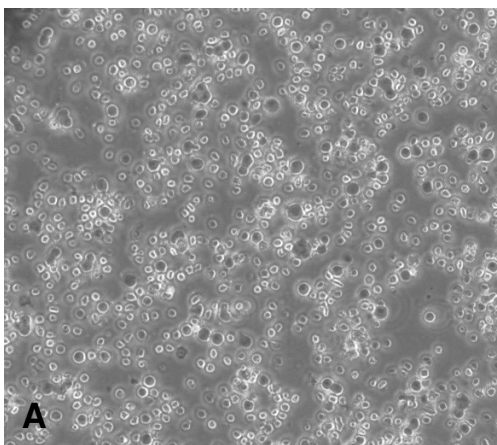
#### **14. Standardabweichung und Signifikanz**

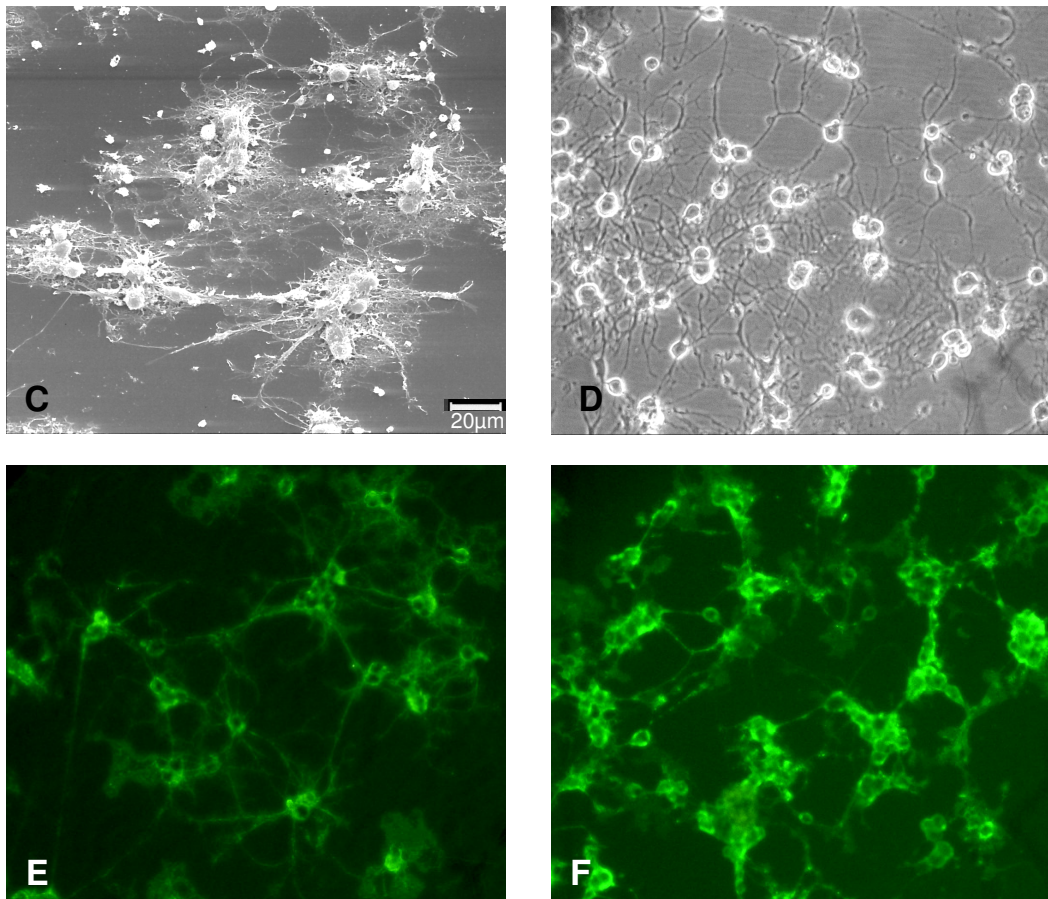
Von quantifizierten Daten wurden die Standardabweichungen berechnet und in Diagrammen dargestellt. Bei zu vergleichenden Werten, deren prozentualer Unterschied innerhalb der biologischen Schwankungsbreite lag, wurde die Signifikanz nach dem Student T-Test geprüft. Lag eine solche vor, wurde sie in den Diagrammen mit einem „\*“ und Angabe der Wahrscheinlichkeit gekennzeichnet. Bei Unterschieden von mehr als 30 % und  $S_D$  Abweichungen unter 10 % wurde auf eine Berechnung der Signifikanz verzichtet.

### III Ergebnisse

#### 1. Kultivierung und Charakterisierung von Schweine-Oligodendrozyten unter Standardbedingungen

Bei der Isolation von OL aus den Hirnen von 6-8 Monate alten Hausschweinen konnten pro Hirn ca. 30-50 Millionen Zellen isoliert werden. Die nach ca. 1 h angehefteten Zellen hatten infolge des Präparations-Vorgangs alle Fortsätze verloren und stellten sich im Phasenkontrastmikroskop als flache abgerundete Zellkörper dar (Abb. 8 A). Dieser „Schockzustand“ hielt etwa 3-4 Tage an, bevor die OL erneut begannen, Fortsätze zu bilden (Abb. 8 B-D). Nach 8-10 DIV waren die Zellen für diverse Versuche am besten geeignet, da sie zu diesem Zeitpunkt bereits kleine Fortsätze ausgebildet hatten und die Reinheit der Kulturen unter diesen Bedingungen bei ca. 95 % lag (ALTHAUS et al., 1991). Um das Wachstum und die Vermehrung von kontaminierenden Zellen zu verhindern, wurde dem Medium der Mitosehemmer Ara-C zugegeben. Bei den wenigen kontaminierenden Zellen handelte es sich meist um flache Astrozyten-ähnliche Zellen (ALTHAUS et al., 1984; GEBICKE-HÄRTER et al., 1984). Die Reinheit der Kulturen ließ sich immunzytochemisch durch Anfärbung der in der oligodendroglialen Plasmamembran exprimierten Proteine MOSP und MOG nachweisen (Abb. 8 E+F), die in Astrozyten und anderen glialen Zellen nicht exprimiert werden (PFEIFFER et al., 1993; DYER und MATTHIEU, 1994).



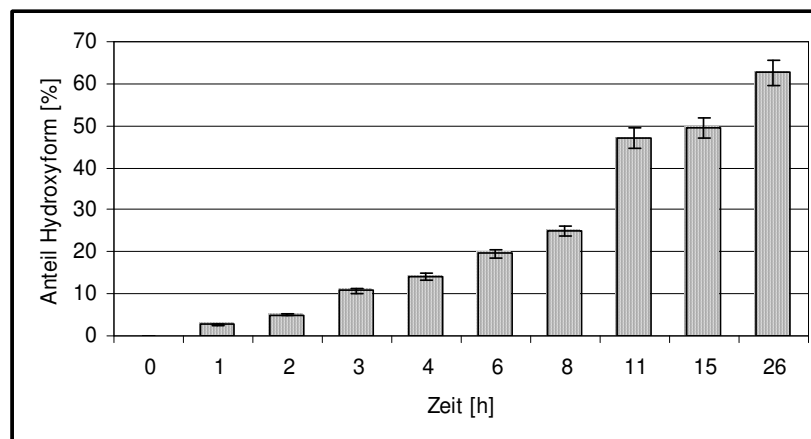


**Abb. 8: Präparation von Schweine-OL.** Aus dem adulten Schweinehirn isolierte OL verloren infolge der Präparation ihre Fortsätze (A). Nach dieser „Schockphase“ begannen die Zellen erneut Fortsätze zu bilden (B, C: 8 DIV), deren Länge mit der Kulturdauer zunahm (D: 14 DIV). Die Reinheit der Kulturen ließ sich durch Anfärben der spezifischen OL-Proteine MOSP (E: 14 DIV) sowie MOG (F: 10 DIV) nachweisen. A, B, D: phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung; C: raster-elektronenmikroskopische Aufnahme; E, F: Aufnahmen der Fluoreszenz in 200facher Vergrößerung.

## 2. HPLC-Analyse zur Umwandlung der inaktiven Sst-Lactonform in die aktive Hydroxyform

Simvastatin ist nur in der Hydroxyform in der Lage, die HMG-CoA Reduktase zu hemmen. In vivo wird die Lactonform durch unspezifische Esterasen in der Leber und anderen Geweben sowie durch nichtenzymatische Hydrolyse in die aktive Form überführt (PRÉGENT, 2000). In Untersuchungen an Neuroblastomzellen konnte gezeigt werden, dass zugegebenes inaktives Mevastatin in vitro größtenteils bereits im Kulturmedium in die Hydroxyform überführt wird (KUMAR et al., 2002). Für Versuche mit Simvastatin stand neben der aktiven Form die inaktive Lactonform zur Verfügung. Eine HPLC-Analyse sollte Aufschluss darüber geben, ob und in welchem

Zeitraum eine Umwandlung der Sst-Lactonform in die aktive Form zu erwarten ist. Um die genaue Erfassung und Zuordnung der Peaks zu gewährleisten, wurde für die Inkubation von Sst-Lacton eine PBS-Lösung verwendet. Zunächst wurden die Retentionszeiten der beiden Standards bestimmt. Während die Hydroxyform bereits nach 6 min detektiert wurde, eluierte die Lactonform erst nach 10 min. Eine Auftrennung der zu definierten Zeitpunkten entnommenen Aliquots zeigte, dass bereits nach 1 h die Hydroxyform auftrat. Nach 26 h standen bereits ~63 % Sst als aktive Form zur Verfügung (Abb. 9). Da es neben der Umwandlung im Kulturmedium wahrscheinlich auch intrazellulär zu einer Metabolisierung in die aktive Form kommt, ist damit gewährleistet, dass relativ rasch ein ausreichender Anteil des aktiven HMG-CoA Reduktase-Inhibitors zur Verfügung steht. Daher konnte für alle weiteren Versuche die Sst-Lactonform verwendet werden.



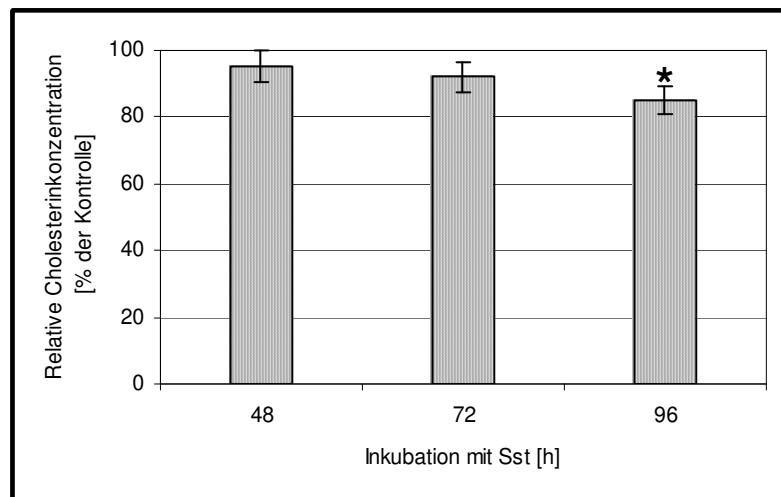
**Abb. 9: HPLC-Analyse zur Umwandlung von Sst-Lacton in die aktive Hydroxyform.** Bereits nach einstündiger Inkubation war die aktive Sst-Hydroxyform messbar. Der Anteil stieg nach 26 h auf ~63 %.

### **3. Simvastatin-Effekte auf primär kultivierte Schweine-Oligodendrozyten**

#### **3.1 Hemmung der Cholesterinsynthese**

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Voraussetzung, dass Sst in der Lage ist, die HMG-CoA Reduktase in OL zu hemmen, was mit einer Senkung des oligodendroglialen Cholesterinspiegels einhergehen sollte. Der Cholesterinwert in Kontroll-OL betrug nach 10 DIV zwischen 10-20  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein. Unter Verwendung

des für die Kultivierung von OL angegebenen herkömmlichen Serums konnte nach Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  Sst keine Reduktion der Cholesterinsynthese gemessen werden. Die Ursache lag in dem hohen Cholesteringehalt des Serums begründet, der je nach Charge zwischen 30-120 mg/100 ml schwankte. Das durch Hemmung der HMG-CoA Reduktase fehlende Cholesterin konnte von den Zellen aus dem Medium aufgenommen und damit ausgeglichen werden. Deshalb wurde in allen weiteren Versuchen mit Sst das „normale“ fötale Kälberserum durch 1 % FCS-GOLD ersetzt, dessen Cholesteringehalt bei jeder Charge definiert war und bei rund 3 mg/100 ml lag. Unter Einsatz von FCS-GOLD war nach 96 h Sst der Cholesteringehalt um ~15 % reduziert (Abb. 10).



**Abb. 10: Messung des oligodendroglialen Cholesteringehaltes.** Die Hemmung der HMG-CoA Reduktase in OL durch Sst (5  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer signifikanten Senkung des Cholesterinspiegels um rund 15 % nach 4 Tagen ( $p=0,021$ ), wenn das „normale“ FCS durch FCS-GOLD ersetzt wurde.

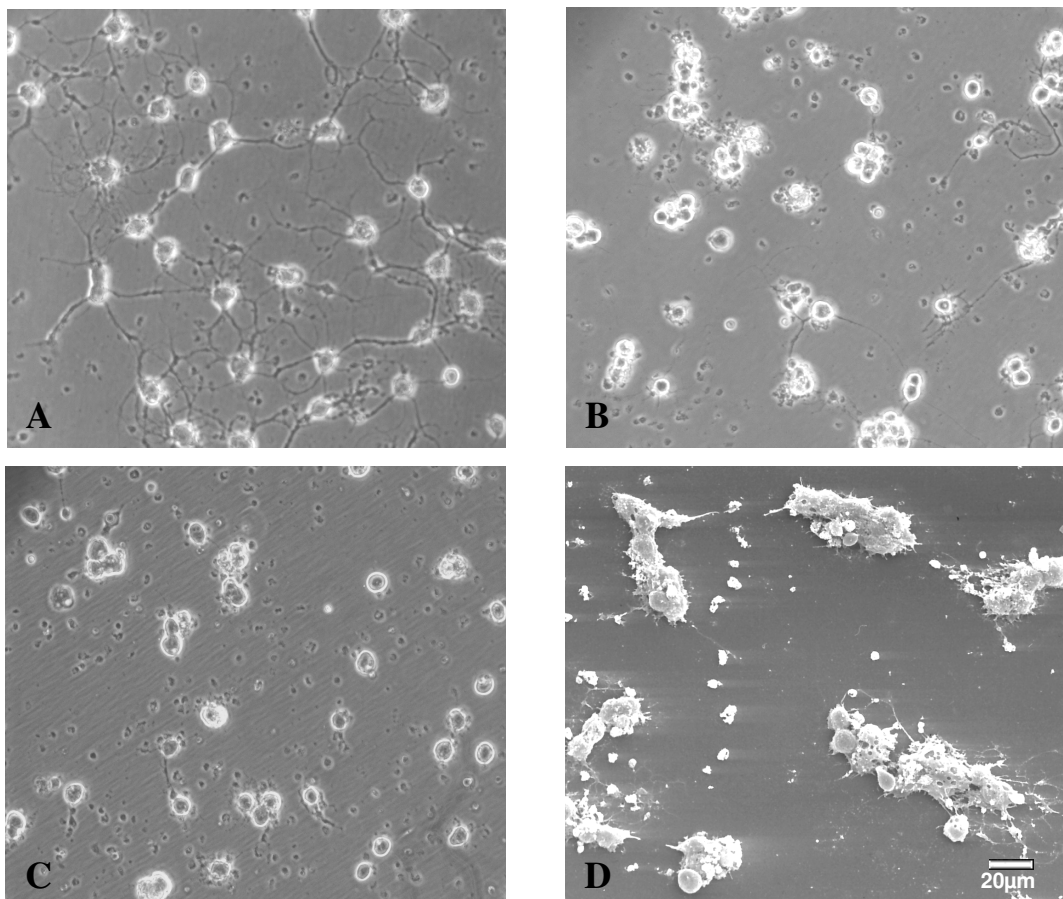
### 3.2 Morphologische Auswirkungen

Für eine Untersuchung der morphologischen Auswirkungen auf OL wurde Sst in verschiedenen Endkonzentrationen (1, 2, 5 und 10  $\mu\text{M}$ ) auf die Zellen gegeben. Bei einmaliger Zugabe von Sst mit den Konzentrationen 2, 5 sowie 10  $\mu\text{M}$  waren die ersten Anzeichen morphologischer Veränderungen lichtmikroskopisch nach 48 h durch eine beginnende Fortsatzretraktion erkennbar, die sich in den folgenden 24 h fortsetzte (Abb. 11 B, D). Hingegen waren diese Effekte bei 1  $\mu\text{M}$  Sst nur dann erkennbar, wenn nach 24 h Inkubation erneut 1  $\mu\text{M}$  Sst zugegeben wurde. In rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen von OL zeigte sich bereits nach 24 h Sst (5  $\mu\text{M}$ ) eine beginnende



Verminderung membranflächiger Fortsätze. Nach vollständiger Retraktion der Fortsätze kugelten sich die OL ab (Abb. 11 C) und begannen, sich vom Boden der Kulturschale abzulösen. Um nicht nur morphologische Auswirkungen zu erzielen, sondern auch um den biochemischen Hintergrund einer Sst-Applikation beleuchten zu können, wurde im folgenden zur Sicherstellung eines Sst-Effekts einmalig 5  $\mu\text{M}$  Sst zugegeben. Diese Sst-Konzentration lag in ihrem Initialwert ca. 2,5fach höher als ein physiologischer ZNS-Wert nach einer oralen Sst-Aufnahme zur Behandlung einer MS.

Ob etwa Proteinkomponenten des Serums die durch Sst ausgelösten morphologischen Veränderungen modifizieren, wurde unter 5  $\mu\text{M}$  Sst und dem Kulturmedium zugesetztem 5 % FCS oder BSA untersucht. Die durch Sst ausgelösten morphologischen Veränderungen unterschieden sich in keiner Weise von den unter 1 % FCS-GOLD beobachteten Effekten.

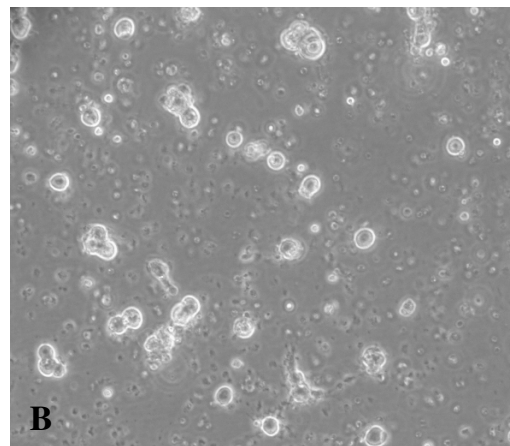
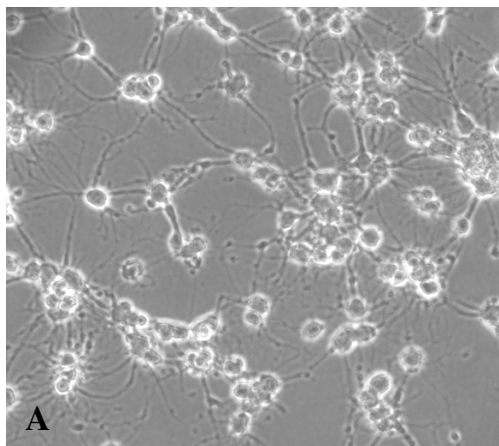


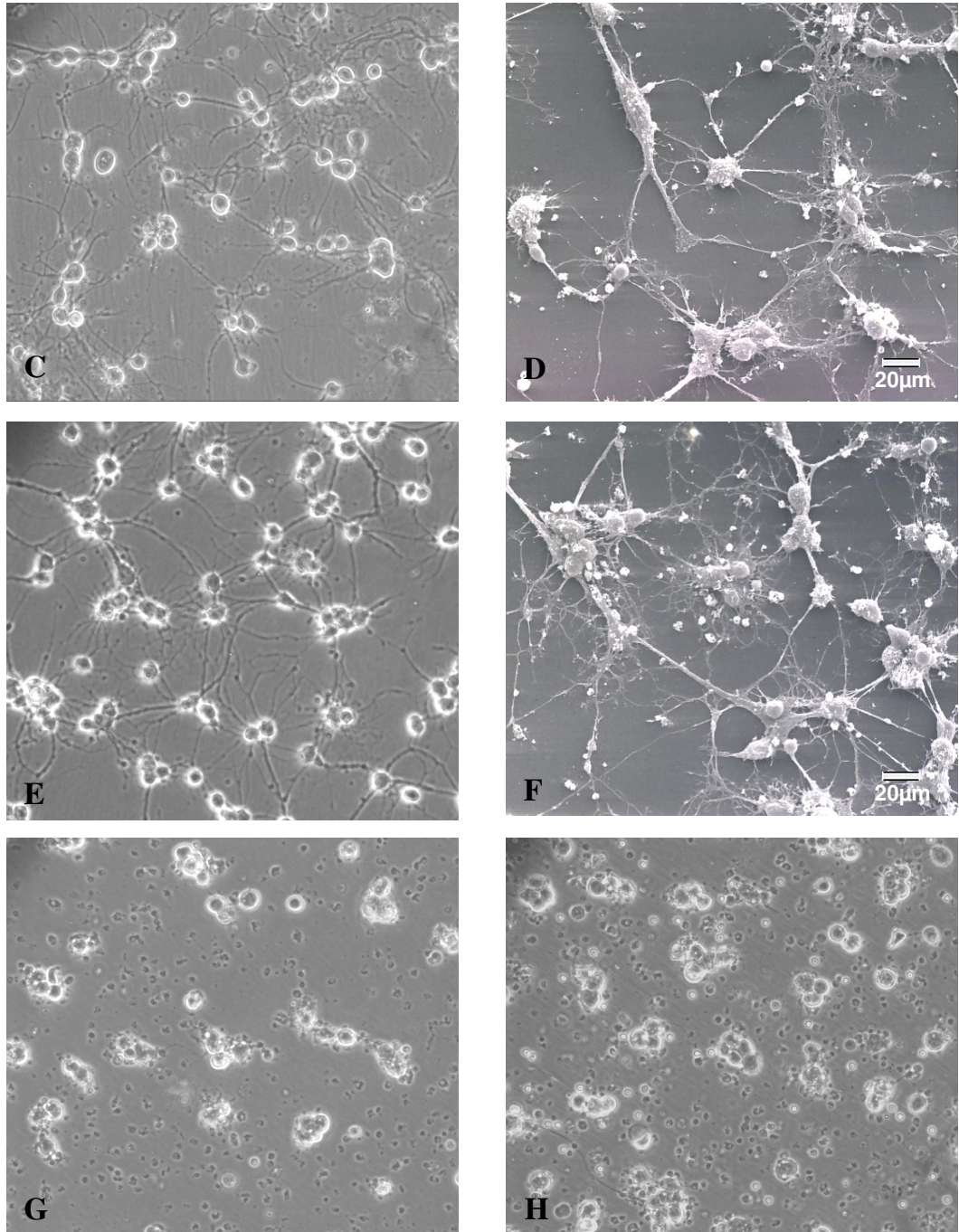
**Abb. 11: Morphologische Effekte von Sst auf primär kultivierte OL.** Die Behandlung von OL (Kontr., 7-10 DIV, A) mit Sst (5  $\mu\text{M}$ ) führte nach 48-72 h zu einer sichtbaren Retraktion der Fortsätze (B, D), gefolgt vom Abkugeln (C) und Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale nach 72-96 h. A-C: phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung, D: rasterelektronenmikroskopische Aufnahme

### 3.3 Kompensation der morphologischen Sst-Auswirkungen durch Intermediate des Cholesterinsyntheseweges

Durch Hemmung der HMG-CoA Reduktase werden Mevalonat und Intermediate wie GGPP und FPP sowie das Endprodukt Cholesterin nicht mehr synthetisiert. Die Inkubation von OL mit 5  $\mu\text{M}$  Sst und jeweils einem der oben aufgeführten Produkte konnte Aufschluss darüber geben, welche Intermediate der Cholesterinsynthese limitierend wirken und maßgeblich an den durch Sst verursachten morphologischen Effekten beteiligt sind. Gleichzeitig konnte so analysiert werden, ob die durch Sst hervorgerufene Fortsatzretraktion und anschließende Abkugelung sowie das Ablösen der OL toxisch bedingt sein könnte.

Durch Zusatz von Mevalonat (100  $\mu\text{M}$ , Abb. 12 C+D) konnte die durch Sst ausgelöste Fortsatzretraktion kompensiert werden; Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, 10  $\mu\text{M}$ , Abb. 12 E+F) war ebenfalls dazu in der Lage, während das Endprodukt Cholesterin (20-100  $\mu\text{g}$  PEG-Cholesterin/2 ml Kulturmedium, Abb. 12 G) keinen Einfluss hatte. Die Zugabe des Intermediates Farnesylpyrophosphat (FPP, 10  $\mu\text{M}$ , Abb. 12 H) führte jedoch zu keiner erkennbaren morphologischen Veränderung des Sst-Effekts. Ein Zusatz von Mevalonat oder GGPP beeinflusste die Fortsatzbildung bei Kontroll-OL nicht.

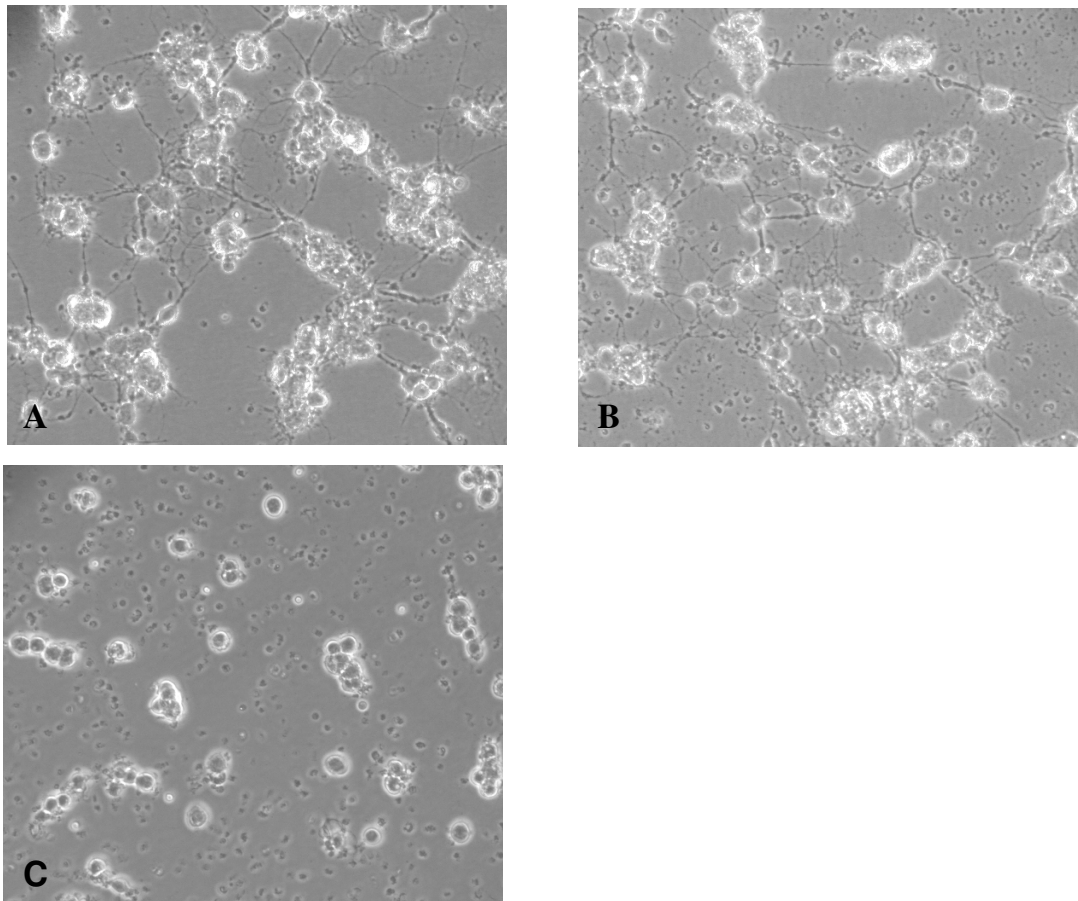




**Abb. 12: Kompensation der morphologischen Sst-Effekte durch Intermediate der Cholesterinbiosynthese.** Eine Zugabe von Sst ( $5 \mu\text{M}$ ) führte in OL (Kontr., 8 DIV, A) nach 72 h zu einer Fortsatzretraktion (B), die durch gleichzeitige Zugabe von Mevalonat ( $100 \mu\text{M}$ , C+D) und GGPP ( $10 \mu\text{M}$ , E+F) kompensiert werden konnte. Im Gegensatz dazu veränderte die Zugabe von Sst + PEG-Cholesterin ( $20\text{-}100 \mu\text{g}/2 \text{ ml}$  Kulturmedium, G) und Sst + FPP ( $10 \mu\text{M}$ , H) die Sst-Wirkung nicht. A, B, C, E, G, H: phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung; D, F: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

### 3.3.1 Transfektion mit FPP

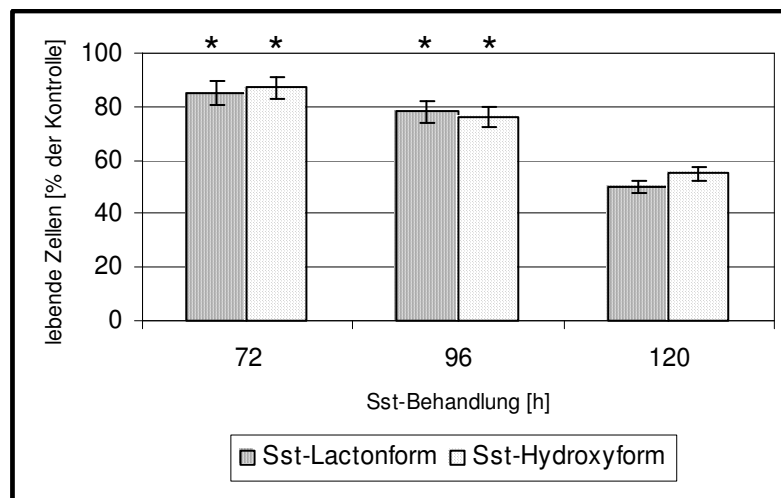
Dass die Zugabe von FPP ohne Wirkung auf eine durch Sst hervorgerufene Fortsatzretraktion blieb, überraschte, lag aber möglicherweise in der eingeschränkten Membrangängigkeit begründet, da FPP weniger hydrophob ist als GGPP (NÈGRE-AMINOU et al., 2001). Mit Hilfe eines Transfektionsagens, das mit siRNA bereits an Schweine-OL erfolgreich eingesetzt werden konnte, wurde deshalb versucht, FPP in die Zellen einzuschleusen (SCHMITZ, 2006). Nach 6-stündiger Transfektion von FPP mit jetSI-Endo wurde im Zuge des Mediumwechsels 5  $\mu$ M Sst zugegeben. Nach 72 h war die unter III.3.2 beschriebene Fortsatzretraktion nicht erkennbar. Die mit FPP transfizierten und mit Sst behandelten Zellen waren mit Kontrollzellen vergleichbar (Abb. 13).



**Abb. 13: Behandlung mit Sst nach Transfektion mit FPP.** OL (8 DIV, A) wurden mit 8  $\mu$ l Transfektionsagens und 9  $\mu$ l FPP-Stammlösung für 6 h transfiziert. Nach Austausch des Transfektionsmediums gegen Kulturmedium wurde Sst (5  $\mu$ M) zugegeben. 72 h später war keine Fortsatzretraktion erkennbar, transfiziertes FPP war in der Lage, die durch Sst ausgelösten morphologischen Effekte zu kompensieren (B). Das Transfektionsagens jet-SI Endo allein verbesserte die Fortsatzretraktion unter Sst nicht (C). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung.

### 3.4 Zelltod nach Applikation von Sst

Bei den durch Sst-Behandlung ausgelösten morphologischen Veränderungen (s.III.3.2) war nach 96-120 h eine Verringerung der Zellzahl zu beobachten. Ein möglicher apoptotischer Effekt von Sst wurde mittels MTT-Assay untersucht. Bei diesem konnte gezeigt werden, dass nach 72 h Sst (5  $\mu\text{M}$ ) die Anzahl vitaler OL um 13-15 % und nach 96 h um 22-24 % im Vergleich zu Kontrollen gesunken war (Abb. 14). Eine deutliche Abnahme lebender Zellen um ca. 50 % war unter Sst-Lacton (5  $\mu\text{M}$ ) nach einer Gesamtdauer von 120 h zu erkennen, ein ähnlicher Wert ergab sich für die Sst-Hydroxyform (5  $\mu\text{M}$ ) mit ca. 45 %. Die Bestimmung des toxischen Sst-Grenzwertes erfolgte durch gleichzeitige Zugabe aufsteigender Sst-Konzentrationen und Mevalonat. Dabei konnte der Sst Effekt ab einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Sst-Lacton) bzw. 150  $\mu\text{M}$  (Hydroxy-Sst) nicht mehr durch Mevalonat kompensiert werden. Unter diesen Sst-Konzentrationen war die Zellzahl bereits nach 24 h deutlich reduziert, nahezu alle Zellen hatten sich vom Boden der Kulturschale abgelöst. Gleichzeitig war der MTT-Wert um ca. 95 % reduziert.

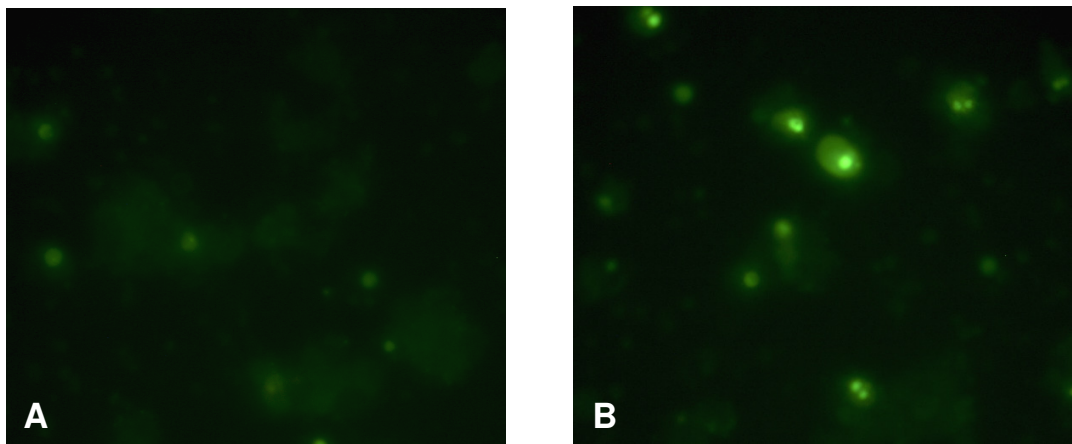


**Abb. 14: Bestimmung der Zellvitalität im MTT Assay.** Die Bestimmung der Zellvitalität im MTT-Assay führte bei Anwendung von Sst-Lacton (5  $\mu\text{M}$ ) und Hydroxy-Sst (5  $\mu\text{M}$ ) zu einer Reduktion lebender OL um ca. 13-15 % ( $p=0,03$ ) nach 72 h. Nach weiteren 24 h war bei Applikation der Lactonform eine Reduktion um 22 % ( $p=0,003$ ) und bei Anwendung der Hydroxyform um 24 % ( $p=0,002$ ) zu verzeichnen. 120 h nach Zugabe von Sst waren unter der Lactonform rund 50 % und unter der Hydroxyform rund 45 % der OL abgestorben.

### 3.5 Detektion apoptotischer Oligodendrozyten im Caspase-3 Assay

Als Reaktion auf schädigende Umwelteinflüsse können Zellen nekrotisch oder apoptotisch absterben. Die wichtigsten Proteasen der Apoptose sind Caspasen, wobei innerhalb der Caspase-Kaskade Caspase-3 eine zentrale Effektorrolle einnimmt. Eine aktive Caspase-3 gilt als spezifisch für Apoptose und kann daher als Marker verwendet werden.

Im MTT-Test (s. III.3.4) konnte gezeigt werden, dass einige OL infolge der Sst-Behandlung absterben, nach insgesamt 72 h Sst (5  $\mu$ M) waren ~15 % weniger vitale Zellen detektierbar. Mit dem Caspase-3 Assays wurde untersucht, ob OL über eine Induktion der Apoptose absterben (Abb. 15). Nach 72 h Sst (5  $\mu$ M) war im Vergleich zu Kontroll-OL eine Aktivierung von Caspase-3 erkennbar, einige Zellkerne zeigten eine starke Fluoreszenz. Dass sich nur wenige Zellen anfärben ließen, korreliert mit dem MTT-Wert, der nach 72 h Sst noch ca. 85-87 % lebende Zellen zeigte.



**Abb. 15: Darstellung apoptotischer Zellen im Caspase-3 Assay.** Das Absterben von einigen OL nach Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M, 72 h) erfolgt über Aktivierung von Caspase-3 durch Apoptose. Im Gegensatz zu Kontroll-OL (A) zeigten einige Sst-behandelte Zellen infolge einer Substratspaltung durch Caspase-3 und Einbau in die DNA eine starke Fluoreszenz der Kerne (B). A+B: Aufnahmen der Fluoreszenz in 400facher Vergrößerung

## 4. Einfluss von Simvastatin auf kleine G-Proteine

Als Voraussetzung für eine Aktivierung und physiologische Funktion kleiner G-Proteine wird angenommen, dass eine Verankerung in der Plasmamembran nötig ist. Diese erfolgt in Abhängigkeit vom jeweiligen G-Protein über eine Farnesylierung mit FPP oder Geranylgeranylierung mit GGPP. Da es unter Sst zu einer verminderten

---

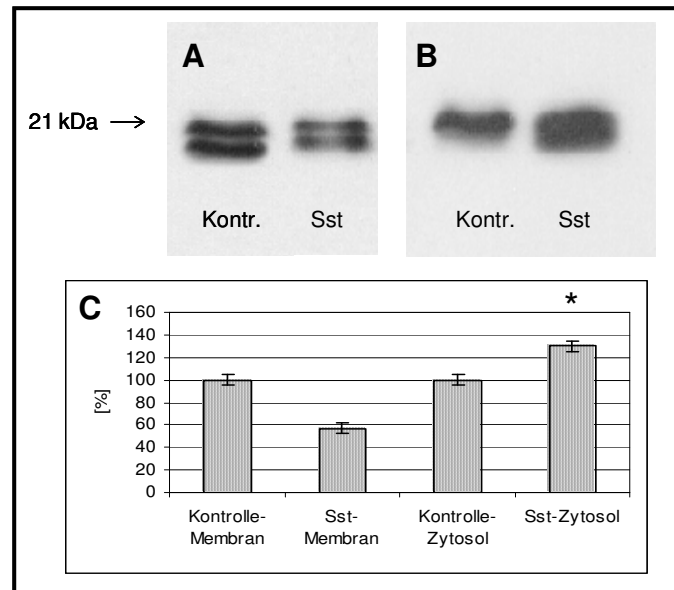
Synthese dieser Intermediate kommt, sollte sich diese auf Membranassoziation und Funktion kleiner G-Proteine auswirken.

## **4.1 p21Ras**

In OL konnte gezeigt werden, dass Ras-Proteine den Ras-MAPK-Signalweg aktivieren, der an der Fortsatzbildung und Myelinproteinsynthese beteiligt ist (STARIHA et al., 1997; HEMPEL, 1998). Die für Aktivierung und Funktion von Ras-Proteinen notwendige Membranassoziation wird durch Prenylierung mit FPP ermöglicht (CASEY, 1995).

### **4.1.1 Membranassoziation von p21Ras unter Sst**

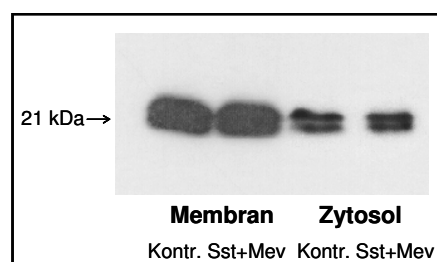
Eine mögliche Verminderung des membrangebundenen Anteils von p21Ras infolge der Sst-Behandlung wurde durch Trennung der zytosolischen Fraktion von der Membranfraktion mittels Ultrazentrifugation untersucht (s. II.5.1.3). Der Anteil an p21Ras ließ sich über Western-Blot mit einem p21Ras-spezifischen Antikörper nachweisen (Abb. 16). Die Behandlung von OL mit Sst (5  $\mu$ M) führte nach 72 h zu einer Reduktion des membrangebundenen p21Ras-Anteils um ca. 40 % und zur Erhöhung des zytosolischen p21Ras-Anteils um ca. 30 %. Für die Darstellung der Membran- und Zytosolfraction im Western Blot wurden die Röntgenfilme jeweils unterschiedlich ECL-exponiert (s. II.5.5). Bei gleicher ECL-Exponierungszeit der beiden zellulären Fraktionen war das Verhältnis zwischen membrangebundenem und zytosolischem p21Ras in der Kontrolle 2:1. Nach Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) kehrte sich dies zu 1:8 um und verdeutlichte damit eine p21Ras Verschiebung von der Membran ins Zytosol.



**Abb. 16: Membranassoziation von p21Ras (21 kDa) unter Sst.** Die Behandlung von OL mit Sst (5  $\mu$ M, 72 h) führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer Reduktion des membrangebundenen Anteils an p21Ras um ca. 40 % (A) und zu einer Erhöhung des zytosolischen p21Ras-Anteils um ca. 30 % (B). In jeder Spur wurden für den Western Blot 20  $\mu$ g Protein aufgetragen. Zur Hervorhebung von Unterschieden zwischen Kontrollen und Sst-behandelten OL in Membran und Zytosol wurden die Röntgenfilme verschieden lang exponiert (A = 3 min, B = 2 min). C: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western-Blot.

#### 4.1.1.1 Kompensation der verringerten Membranassoziation durch Zugabe von Mevalonat

In Abb. 12 wurde gezeigt, dass es unter Mevalonat zu keinen Sst-typischen morphologischen Effekten kam. Da aus Mevalonat auch alle weiteren Intermediate wie FPP und GGPP synthetisiert werden, wurde angenommen, dass die infolge der Sst-Behandlung nachgewiesene verminderte Membranassoziation von p21Ras kompensiert wird; dies konnte in der Tat gezeigt werden (Abb. 17).



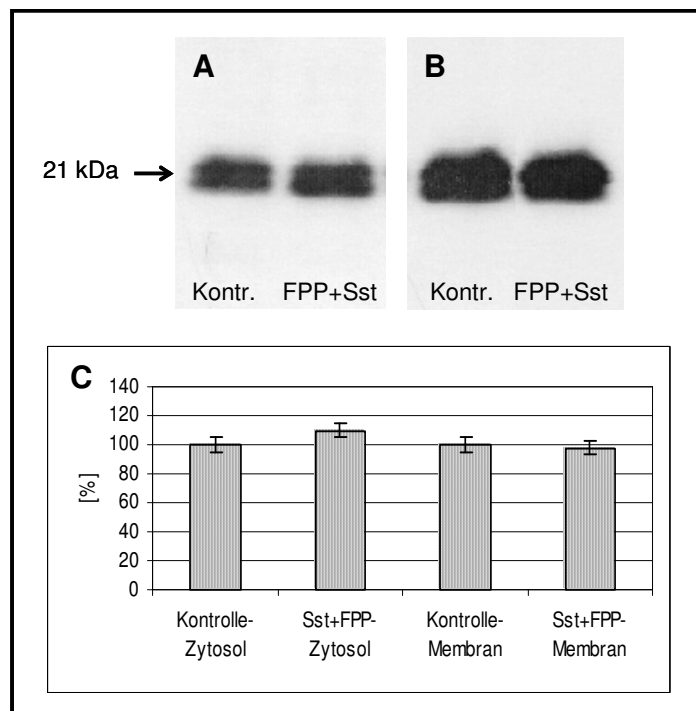
**Abb. 17: Kompensation der infolge einer Sst-Behandlung verminderten Membranassoziation von p21Ras (21 kDa).** A: Durch gleichzeitige Zugabe von Sst (5  $\mu$ M) und Mevalonat (100  $\mu$ M) für 72 h



konnte die unter III.4.1.1 beschriebene verminderte Membranassoziation von p21Ras kompensiert werden. Für den Western Blot wurden in jeder Spur 25  $\mu$ g Protein aufgetragen.

#### 4.1.1.2 Kompensation der verringerten Membranassoziation durch Transfektion mit FPP

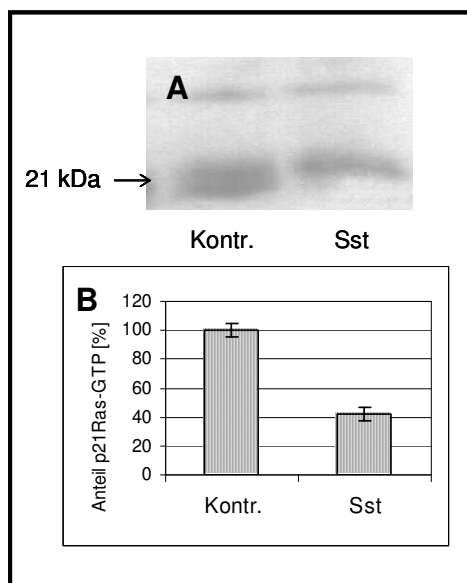
Unter III.3.3.1 konnte gezeigt werden, dass transfiziertes FPP die durch Sst ausgelösten morphologischen Effekte kompensieren konnte. Daher bot sich an, zu untersuchen, ob FPP auch in der Lage war, die Membranassoziation von p21Ras bei gleichzeitiger Gabe von Sst zu beeinflussen. Nach Trennung von Zytosol und Membran konnte beim Nachweis von p21Ras im Western Blot kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Kontroll-OL und den nach FPP-Transfektion mit Sst behandelten OL festgestellt werden (Abb. 18).



**Abb. 18: Membranassoziation von p21Ras (21 kDa) nach Transfektion mit FPP und Behandlung mit Sst.** OL wurden mit FPP transfiziert und im Anschluss für 72 h mit Sst (5  $\mu$ M) behandelt. Nach Trennung der Membranfraktion von der zytosolischen Fraktion wurde p21Ras im Western Blot nachgewiesen. Dabei wich der zytosolische (A) und der membrangebundene (B) Anteil nach Transfektion mit FPP und Zugabe von Sst nicht signifikant von den Kontrollen ab. Bei der Auftrennung im SDS-Gel wurden je Spur 25  $\mu$ g Protein aufgetragen. C: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

#### 4.1.2 Bestimmung des GTP-gebundenen Anteils an p21Ras

Nur die aktivierte, GTP-gebundene Form von p21Ras ist in der Lage, über Raf eine Signalkaskade auszulösen. In dem angewandten Assay ist die p21Ras-Bindedomäne von Raf als Fusionsprotein an Glutathion-Agarose-Beads gebunden. Während der Inkubation mit dem Zelllysate konnte folglich nur GTP-gebundenes p21Ras an Beads koppeln. Die an Beads gebundenen Proteine wurden im Western Blot nach p21Ras untersucht. Die Behandlung von OL mit Sst führte nach 72 h zu einer Reduktion des GTP-gebundenen Anteils an p21Ras um ca. 60 % (Abb. 19).

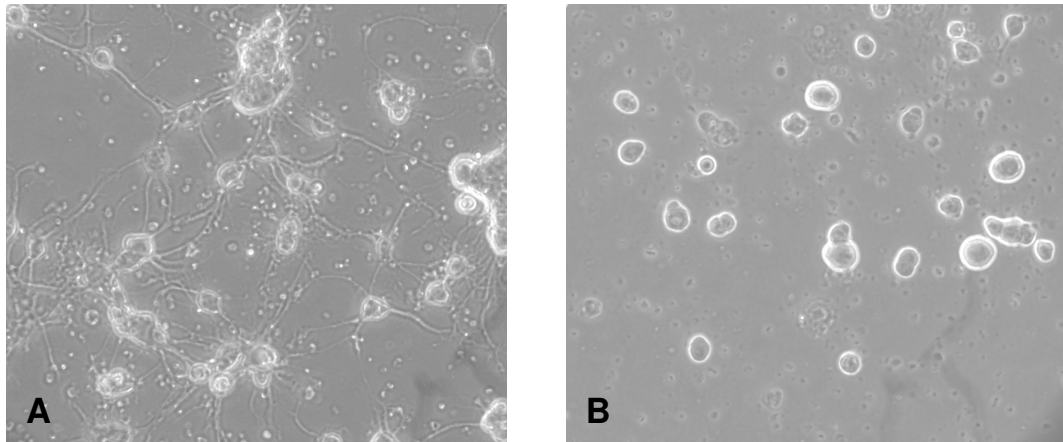


**Abb. 19: Bestimmung des Anteils an p21Ras-GTP (21 kDa) nach Behandlung mit Sst für 72 h über Aktivitätsassay.** Der mit Hilfe des p21Ras-Pull-Down-Assays bestimmte Anteil an p21Ras-GTP war nach Behandlung der OL mit Sst um ca. 60 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert (A). Für die Inkubation mit dem Zelllysate wurden jeweils 30  $\mu$ l Beads sowie 100  $\mu$ g OL-Protein eingesetzt. B: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

## 4.2 Rho-Proteine

In Abb. 12 wurde gezeigt, dass die durch Sst hervorgerufene Fortsatzretraktion durch gleichzeitige Zugabe von 10  $\mu$ M GGPP kompensiert werden konnte. Eine Bedeutung von GGPP wurde dadurch unterstrichen, dass die Behandlung mit einem Geranylgeranyltransferase-Inhibitor (GGTI-286), der die Prenylierung von Rho-Proteinen mit GGPP verhindert, ebenfalls zu Fortsatzretraktion und Abkugeln von OL führte (Abb. 20). Dabei kam es bei einer GGTI-Konzentration zwischen 5-50  $\mu$ M

bereits nach 24 h zu einer Retraktion der Fortsätze; ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  lysierten die Zellen.



**Abb. 20: Effekt von GGTI-286 auf OL.** Die Behandlung von OL (10 DIV, A) mit GGTI-286 (5-50  $\mu\text{M}$ ) führte nach 24 h zur Retraktion der Fortsätze (B) und nach weiteren 24-48 h zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale. Ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wirkte GGTI-286 toxisch. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung.

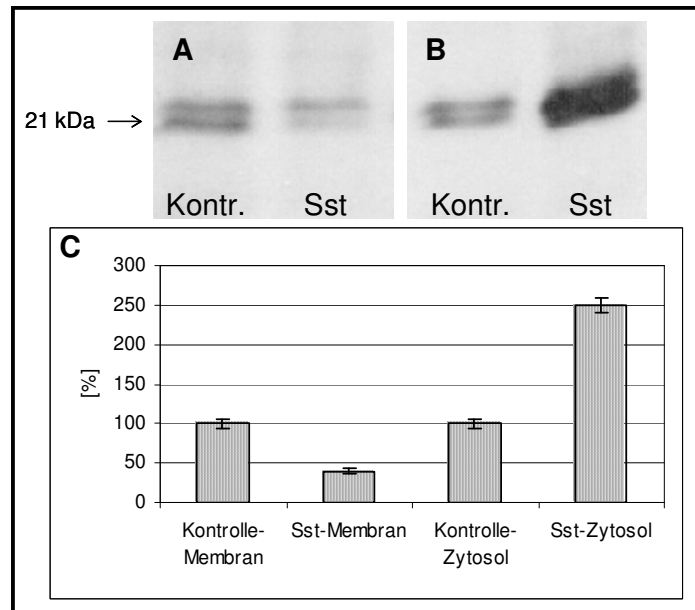
#### 4.2.1 RhoA

Über eine Aktivierung von RhoA werden Formierung und Kontraktion von Stressfasern reguliert; diese inserieren an fokalen Zellkontakten (Zell-Substrat, Zell-Zellkontakt) und können die gesamte Zelle durchziehen. Kommt es zu einem Lösen dieser Kontakte, wie z.B. physiologisch bei der Mitose oder pathophysiologisch bei toxischer Änderung des Zellmilieus, kugeln sich die Zellen ab. Wie unter III.4.2 beschrieben wird angenommen, dass die Prenylierung von Rho-Proteinen eine Voraussetzung für ihre Membranassoziation und Funktion darstellt.

##### 4.2.1.1 Membranassoziation von RhoA

Um den Einfluss von Sst auf die Membranassoziation von RhoA in OL zu untersuchen, wurde 72 h nach Zugabe von Sst (5  $\mu\text{M}$ ) die zytosolische Fraktion von der Membranfraktion getrennt und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen RhoA untersucht. Infolge der Sst-Behandlung kam es zu einer Reduktion des membrangebundenen RhoA-Anteils um ca. 60 % und zu einer Erhöhung des zytosolischen RhoA-Anteils um ca. 150 % (Abb. 21). Membran- und Zytosolfraction

wurden im Western Blot unterschiedlich ECL-exponiert (s. II.5.5). Bei gleicher Exponierungszeit ließ sich durch Berechnung der Verhältnisse von Membran zu Zytosol eine durch Sst hervorgerufene Verschiebung von membrangebundenem zu zytosolischem RhoA hervorheben. Während das Verhältnis der beiden Fraktionen in der Kontrolle 1:2 betrug, war mit einem Wert von 1:11 nach Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) eine deutliche Verschiebung von der Membran ins Zytosol erkennbar.

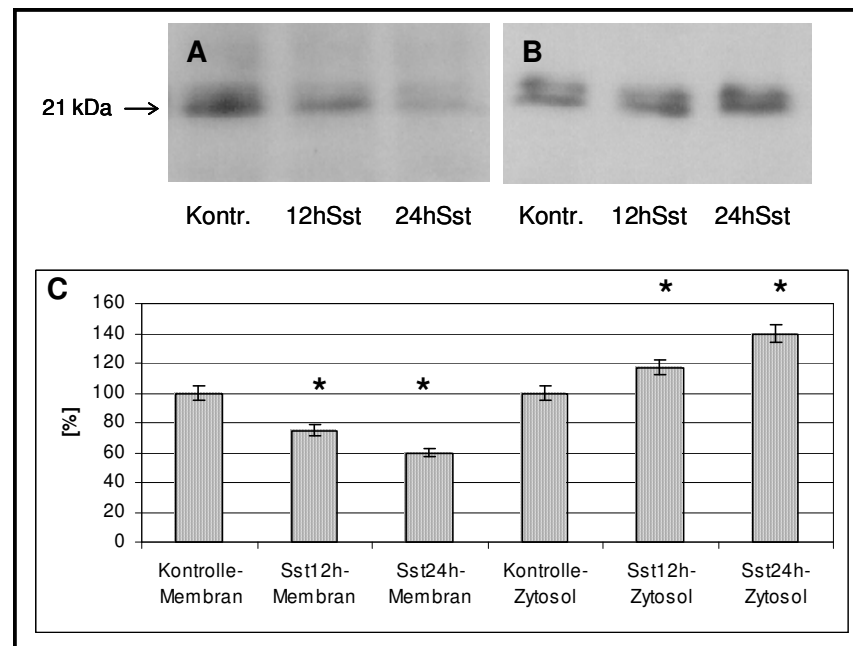


**Abb. 21: Membranassoziation von RhoA (21 kDa) unter Sst.** Die Behandlung von OL mit Sst (5  $\mu$ M) für 72 h führte im Vergleich zu Kontrollen zu einer Reduktion des membrangebundenen Anteils von RhoA um ca. 60 % (A) und zur Erhöhung des zytosolischen Anteils um ca. 150 % (B). In jeder Spur wurden 30  $\mu$ g Protein aufgetragen. Zur Hervorhebung von Unterschieden zwischen Kontrollen und Sst-behandelten OL in Membran und Zytosol wurden die Röntgenfilme verschieden lang exponiert (A = 20 min, B = 7 min). C: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

#### 4.2.1.2 Zeitlicher Ablauf einer Sst-bedingten Verminderung der Membranassoziation von RhoA

Die ersten Zeichen morphologischer Veränderungen von OL ließen sich raster-elektronenmikroskopisch bereits 24 h nach Zugabe von Sst (5  $\mu$ M) erkennen. Interessant war deshalb, festzustellen, ab wann eine Veränderung der Membranassoziation nachgewiesen werden konnte. Dafür wurden OL für 12 und 24 h mit Sst behandelt. Die Verschiebung der Membranassoziation von RhoA zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde analog zu III.4.2.1.1 untersucht. Eine

Quantifizierung der Banden im Western Blot ergab, dass im Vergleich zu Kontrollen schon nach 12 h eine Veränderung der Membranassoziation erkennbar war (Abb. 22).



**Abb. 22: Zeitlicher Ablauf der veränderten Membranassoziation von RhoA (21 kDa) unter Sst.** Die Behandlung von OL mit Sst (5  $\mu$ M) führte im Vergleich zur Kontrolle bereits nach 12 h zur Verringerung des membrangebundenen Anteils um ca. 25 % ( $p=0,013$ ) und nach insgesamt 24 h um ca. 40 % (A). Der zytosolische Anteil, der nach 12 h Sst um ca. 15 % ( $p=0,041$ ) erhöht war, stieg nach weiteren 12 h um insgesamt 40 % im Vergleich zur Kontrolle an (B). In jeder Spur wurden 30  $\mu$ g Protein aufgetragen. C: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

#### 4.2.1.3 Kompensation der verringerten Membranassoziation von RhoA durch Mevalonat

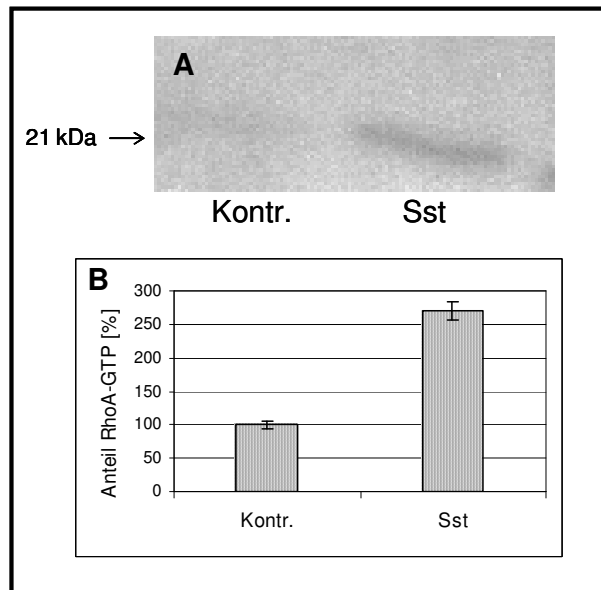
In Abb. 12 konnte man sehen, dass es unter Mevalonat und Sst zu keiner Fortsatzretraktion kam. Eine durch Sst (5  $\mu$ M) hervorgerufene verringerte Membranassoziation von RhoA konnte bei gleichzeitiger Zugabe von Mevalonat (100  $\mu$ M) nicht mehr festgestellt werden (Abb. 23).



**Abb. 23: Kompensation der infolge einer Sst-Behandlung verminderten Membranassoziation von RhoA (21 kDa) durch Mevalonat.** Einer verminderten Membranassoziation von RhoA durch Sst (5  $\mu$ M, 72 h) (s. III.4.2.1.1) konnte bei gleichzeitiger Zugabe von Mevalonat (100  $\mu$ M, 72 h) entgegengewirkt werden. Für den Western Blot wurden in jeder Spur 35  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die ECL-Exponierungszeit betrug für beide Fraktionen 18 min.

#### 4.2.1.4 Bestimmung des GTP-gebundenen Anteils von RhoA

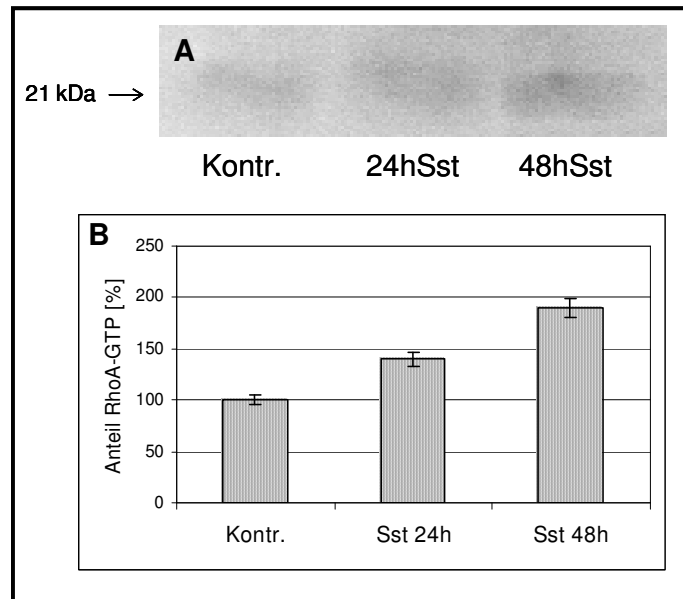
Für das Auslösen einer Signalkaskade müssen sich Rho-Proteine im aktivierten, GTP-gebundenen Zustand befinden. Da die Aktivierung analog zu p21Ras an der Membran erfolgen sollte, war zu untersuchen, ob sich in OL die durch Sst ausgelöste Verringerung der Membranassoziation von RhoA auf dessen Aktivität auswirkt. Dazu wurde ein Aktivitäts-Pull-Down-Assay verwendet, bei dem die Bindedomäne eines Effektors, welche RhoA-GTP erkennt, als Fusionsprotein an Glutathion-Agarose-Beads gekoppelt war. Durch Inkubation mit dem Zellysat konnte damit nur aktiviertes, GTP-gekoppeltes RhoA an die Beads binden, das im anschließenden Western-Blot mit einem Antikörper gegen RhoA dargestellt wurde. Dabei war zu beobachten, dass die Behandlung mit Sst nach 72 h entgegen der Erwartung zu einem deutlichen Anstieg der aktivierten, GTP-gebundenen Form von RhoA führte. Unter Kontrollbedingungen war kaum RhoA-GTP detektierbar (Abb. 24).



**Abb. 24: Bestimmung des Anteils an RhoA-GTP (21 kDa) nach Behandlung mit Sst über Aktivitätsassay.** Die Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) für 72 h führte im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg der GTP-gebundenen Form von RhoA um 170 % (A). Für die Inkubation mit dem Zelllysat wurden jeweils 35  $\mu$ l Beads sowie 200  $\mu$ g OL-Protein eingesetzt. B: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

#### 4.2.1.5 Zeitlicher Verlauf der Zunahme des GTP-gebundenen Anteils an RhoA durch Behandlung mit Sst

Unter III.4.2.1.2 wurde gezeigt, dass eine Verringerung der Membranassoziation von RhoA in OL bereits nach 12 h und deutlicher nach 24 h Sst-Behandlung eintrat. Ob dies gleichzeitig mit einer Zunahme von RhoA-GTP einherging, wurde über Bestimmung der Aktivität ermittelt. Die Analyse mittels RhoA-Pull-Down-Assay ergab, dass es nach 24 h Sst (5  $\mu$ M) zum Anstieg der RhoA-GTP-Form um ca. 40 % kam. Nach 48 h war der Anteil insgesamt um ca. 90 % im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb. 25).

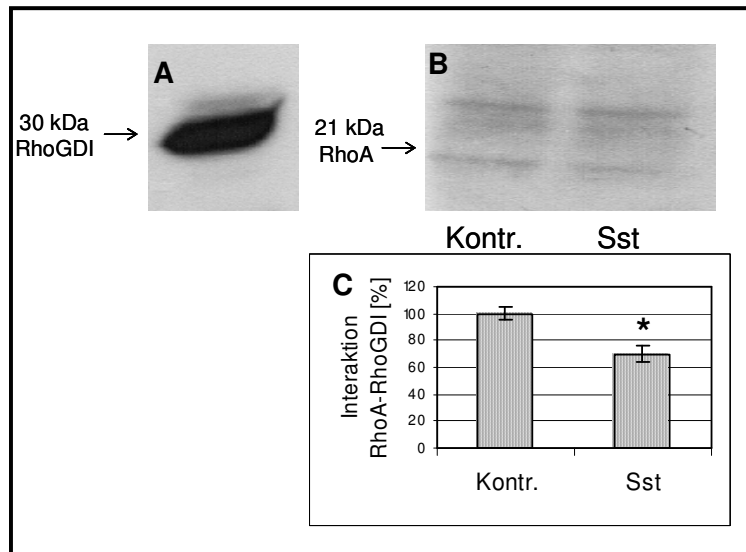


**Abb. 25: Zeitlich abhängige Zunahme des Anteils an RhoA-GTP (21 kDa) nach Behandlung mit Sst.** Die Behandlung mit Sst (5 $\mu$ M) führte im Vergleich zu Kontrollen nach 24 h zum Anstieg des RhoA-GTP Anteils um ca. 40 %. Nach weiteren 24 h war der Anteil der aktivierten RhoA-Form im Vergleich zur Kontrolle um ca. 90 % erhöht (A). Für die Inkubation mit dem Zelllysate wurden jeweils 35  $\mu$ l Beads und 250  $\mu$ g OL-Protein eingesetzt. B: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

#### 4.2.1.6 Interaktion von RhoA mit RhoGDI

Rho Proteine werden im Gegensatz zu Ras-Proteinen über einen dritten Mechanismus reguliert. Die zytosolischen Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) binden den prenylierten Teil von Rho-Proteinen und verhindern durch diese Maskierung deren Membranassoziation und Aktivierung. Da es infolge einer Sst-Behandlung zur Hemmung der Synthese von GGPP kommt, stellte sich die Frage, ob dadurch die Interaktion von Rho-Proteinen mit RhoGDI beeinträchtigt wird. Dass RhoGDIs in OL nachweisbar sind, konnte im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper durch Entstehung einer Bande bei ca. 30 kDa gezeigt werden. Für den Nachweis einer Interaktion mit RhoA wurde Zelllysate zusammen mit ProteinA-Sepharose-Beads und Anti-RhoGDI inkubiert. Im anschließenden Western Blot war mit Hilfe eines spezifischen RhoA-Antikörpers nur das an RhoGDI komplexierte RhoA detektierbar. Die Behandlung von OL mit Sst (5  $\mu$ M) führte zu einer nachweisbaren Verminderung der Interaktion von RhoA mit RhoGDI um ca. 30 % (Abb. 26).

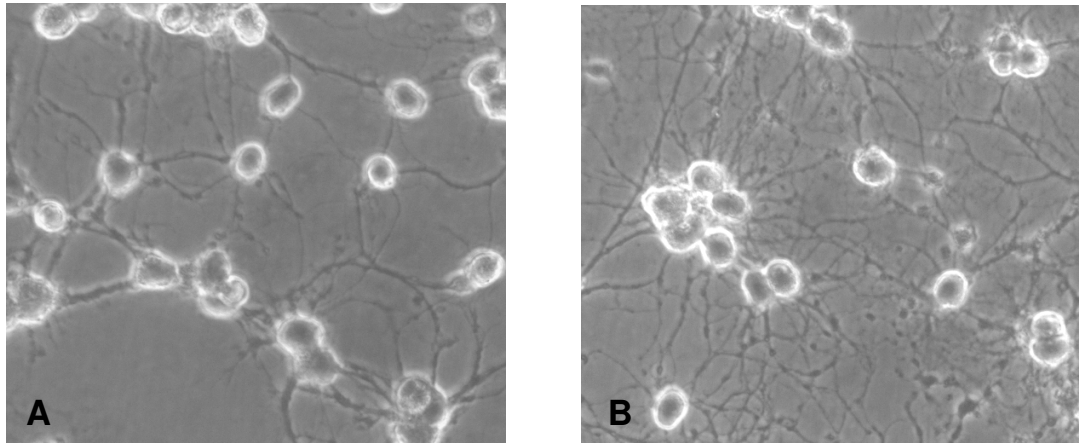




**Abb. 26: Interaktion von RhoA mit RhoGDI im Western Blot.** A: Detektion von RhoGDI im Western Blot (Kontroll-OL, 50 µg Protein). B+C: Nachweis einer Interaktion von RhoA mit RhoGDI über Detektion von RhoA im Western Blot. Die Behandlung von OL mit Sst (5 µM, 72 h) führte infolge der verminderten Prenylierung von RhoA im Vergleich zur Kontrolle zu einer verringerten Interaktion mit RhoGDI um ca. 30 % ( $p=0,019$ ) (B). Für die Inkubation der Beads mit dem Zellysate wurden jeweils 500 µg OL-Protein eingesetzt. C: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

#### 4.2.2 Rho-Kinase Inhibitor

Im aktivierten Zustand kann RhoA die Rho-Kinasen ROCK I und II stimulieren, wobei die Isoform ROCK II vor allem im Hirngewebe exprimiert wird (NIKOLIC, 2002; MUELLER et al., 2005). Um zu untersuchen, ob eine Modulation der ROCK-Aktivität sich überhaupt auf die oligodendrogliale Fortsatzbildung auswirkt, wurde zunächst ein Inhibitor dieser Kinasen (Y27632) eingesetzt. Ab einer Konzentration des Inhibitors von 5 µM war nach 24 h eine vermehrte Fortsatzbildung erkennbar. Gegenüber der Kontrolle waren mehr feine und stark verzweigte Fortsätze sichtbar (Abb. 27).

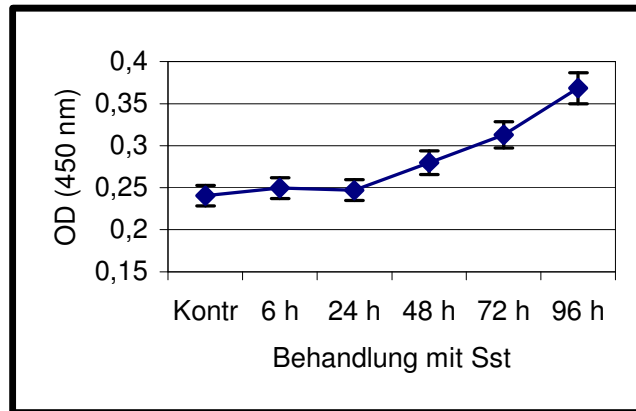


**Abb. 27: Einfluss des Rho-Kinase (ROCK)-Inhibitors Y27632 auf kultivierte OL.** Die Behandlung von OL (10 DIV, A) mit Y27632 (5  $\mu$ M) führte nach 24 h zu einer deutlich verstärkten Fortsatzbildung (B). Dabei nahm primär nicht die Länge der Fortsätze sondern deren Anzahl und Verzweigungsgrad zu. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen in 400facher Vergrößerung.

#### 4.2.3 Aktivität von ROCK

ROCK kontrolliert das Aktin-Zytoskelett, die Zellkontraktilität und Zelladhäsion (RIENTO und RIDLEY, 2003). Dass infolge der Sst-Behandlung ein erhöhter RhoA-GTP-Anteil gefunden wurde, und Y27632 zu einem verstärkten Fortsatzwachstum führte, gab Grund zu der Vermutung, dass bei der Fortsatzretraktion unter Sst ROCK aktiviert wird.

In der Tat konnte mit Hilfe des Assays, bei dem der Umsatz eines Substrates durch ROCK photometrisch erfasst wurde, eine infolge der Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) stattfindende Aktivierung von ROCK nachgewiesen werden (Abb. 28). Nach 72 h Sst war die Aktivität gegenüber der Kontrolle um ~30 % und nach weiteren 24 h um insgesamt ~50 % erhöht.

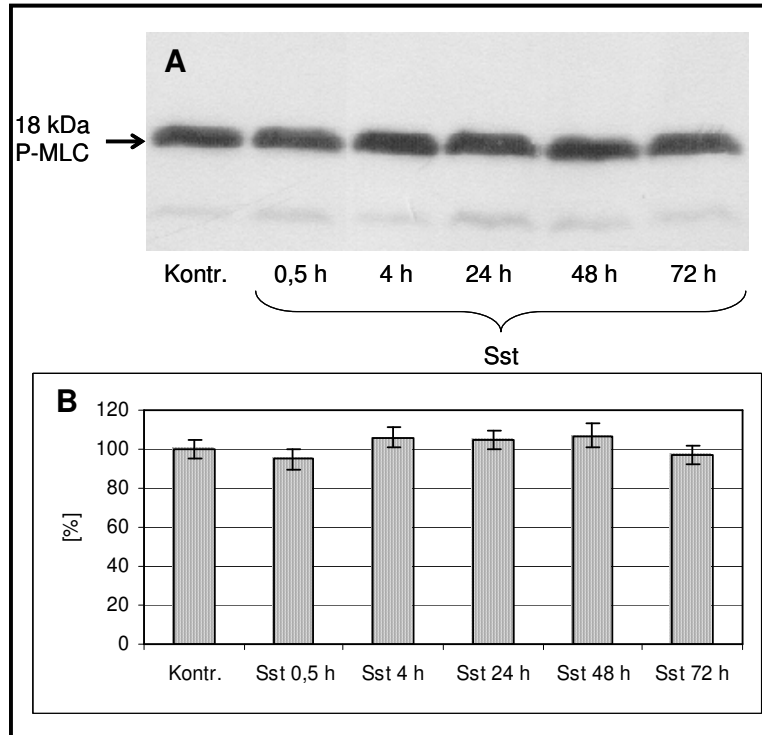


**Abb. 28: Aktivität von ROCK nach Behandlung mit Sst.** Eine Zugabe von Sst ( $5 \mu\text{M}$ ) zu Schweine-OL führte nach 48 h zu einem nachweisbaren Anstieg der Aktivität im Vergleich zu Kontroll-OL. Nach insgesamt 72 h Sst war die Aktivität um  $\sim 30\%$  erhöht, weitere 24 h später um insgesamt  $\sim 50\%$ .

#### 4.2.4 Phosphorylierung der leichten Myosinketten

Die Phosphorylierung der leichten Myosinketten (MLC) durch die „myosin-light-chain-kinase (MLCK)“ ermöglicht die Interaktion von Myosin mit Aktin, was neben einer Zellstabilisierung physiologisch wie pathophysiologisch zu einer Fortsatzretraktion führen kann. MLC-Phosphorylierung wird durch eine entsprechende MLC-Phosphatase antagonisiert. Durch RhoA aktivierte Rho-Kinase kann MLC direkt phosphorylieren, aber auch über Phosphorylierung der MLC-Phosphatase, die dadurch gehemmt wird, zu einer Phosphorylierung von MLC beitragen.

Es konnte gezeigt werden, dass die durch Sst ausgelöste Fortsatzretraktion mit einer Erhöhung des GTP-gebundenen Anteils an RhoA (s. III.4.2.1.4) und Aktivierung von ROCK (s. III.4.2.3) einherging. Ob es unter Sst zu einem Anstieg an phosphorylierten MLC in OL kommt, wurde über eine Veränderung der Phosphorylierung von MLC mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot untersucht (Abb. 29). OL wurden dazu für verschiedene Zeiten mit Sst ( $5 \mu\text{M}$ ) behandelt. Eine signifikante Veränderung der MLC-Phosphorylierung war jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte erkennbar.



**Abb. 29: Phosphorylierte MLC (18 kDa) in OL unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Sst.** Gegenüber der Kontrolle führte die Zugabe von Sst (5  $\mu$ M) bei keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer deutlichen Erhöhung der MLC-Phosphorylierung (A). In jeder Spur wurden 20  $\mu$ g OL-Protein aufgetragen. B: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

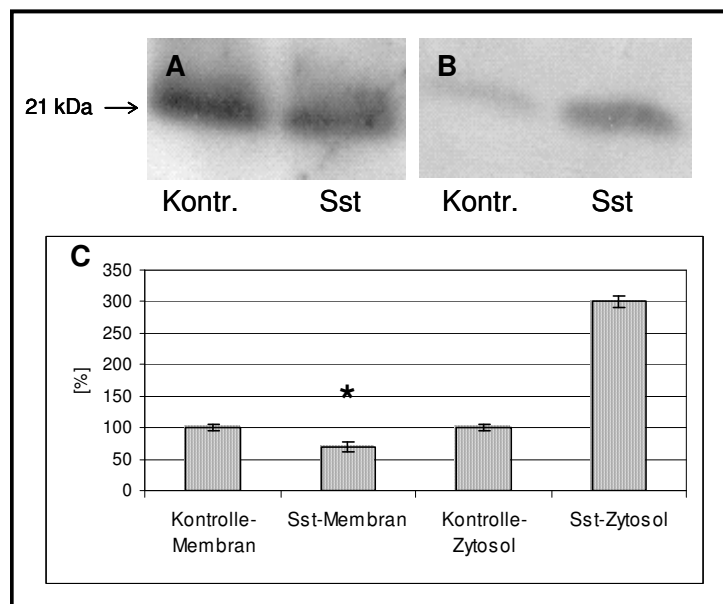
#### 4.2.5 RhoG

Ein weiteres Rho-Protein, dass z.B. in PC12-Zellen für ein NGF-induziertes Auswachsen der Fortsätze verantwortlich gemacht wird, ist RhoG (KATOH et al., 2000). Histochemische Befunde wiesen darauf hin, dass RhoG in OL besonders angereichert ist; vermutlich ist es bei der oligodendroglialen Fortsatzbildung während der Myelinisierung involviert (ISHIKAWA et al., 2002). Da RhoG ebenfalls durch GGPP posttranslational modifiziert wird, wurde der Effekt von Sst auf dessen Membranassoziation und Funktion untersucht.

##### 4.2.5.1 Membranassoziation von RhoG

Für die Untersuchung des Effekts von Sst auf die Membranassoziation von RhoG in OL wurde nach Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) für 72 h die zytosolische Fraktion von der Membranfraktion getrennt. Die Detektion von RhoG erfolgte im Western-Blot mittels RhoG-spezifischen Antikörpers. Infolge der Sst-Behandlung kam es in OL im Vergleich

zur Kontrolle zu einer verminderten Membranassoziation von RhoG um ca. 30 % sowie zu einer Erhöhung des zytosolischen Anteils an RhoG auf das 3fache (Abb. 30). Membran- und Zytosolfraction wurden im Anschluss an den Western Blot unterschiedlich ECL-exponiert (s. II.5.5). Ein quantitativer Vergleich der Verhältnisse von membrangebundenem zu zytosolischem RhoG in der Kontrolle sowie nach Behandlung mit Sst erfolgte jedoch anhand gleicher ECL-Exponierungszeiten. Während das Verhältnis der beiden Fraktionen in der Kontrolle 5:1 betrug, wurde mit einem Wert von 1:1 nach Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) eine deutliche Verschiebung von membrangebundenem zu zytosolischem RhoG sichtbar.

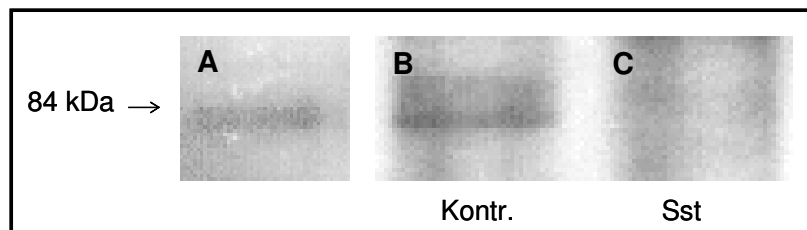


**Abb. 30: Membranassoziation von RhoG (21 kDa) unter Sst.** Die Behandlung von OL mit Sst (5  $\mu$ M) für 72 h führte zur Reduktion des membrangebundenen Anteils an RhoG um ca. 30 % ( $p=0,002$ ) (A) sowie zu einer Erhöhung des zytosolischen Anteils an RhoG um ca. 200 % (B). In jeder Spur wurden 50  $\mu$ g Protein aufgetragen. Zur Hervorhebung von Unterschieden zwischen Kontrollen und Sst-behandelten OL in Membran und Zytosol wurden die Röntgenfilme verschieden lang exponiert (A = 8 min, B = 5 min) C: Scion-Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

#### 4.2.5.2 Bestimmung der Aktivität von RhoG

Ein für RhoG spezifisches, kommerziell erhältliches Aktivitätsassay stand nicht zur Verfügung; deshalb wurde eine Methode entwickelt, bei der Proteine, die in der Signalkaskade von RhoG vorkommen, als Hilfe herangezogen wurden. Zu diesen gehört auch Elmo2, das als spezifisches Adaptorprotein von RhoG nur die aktivierte, GTP-gekoppelte Form bindet (KATOHI und NEGISHI, 2003). Da in der Literatur bisher

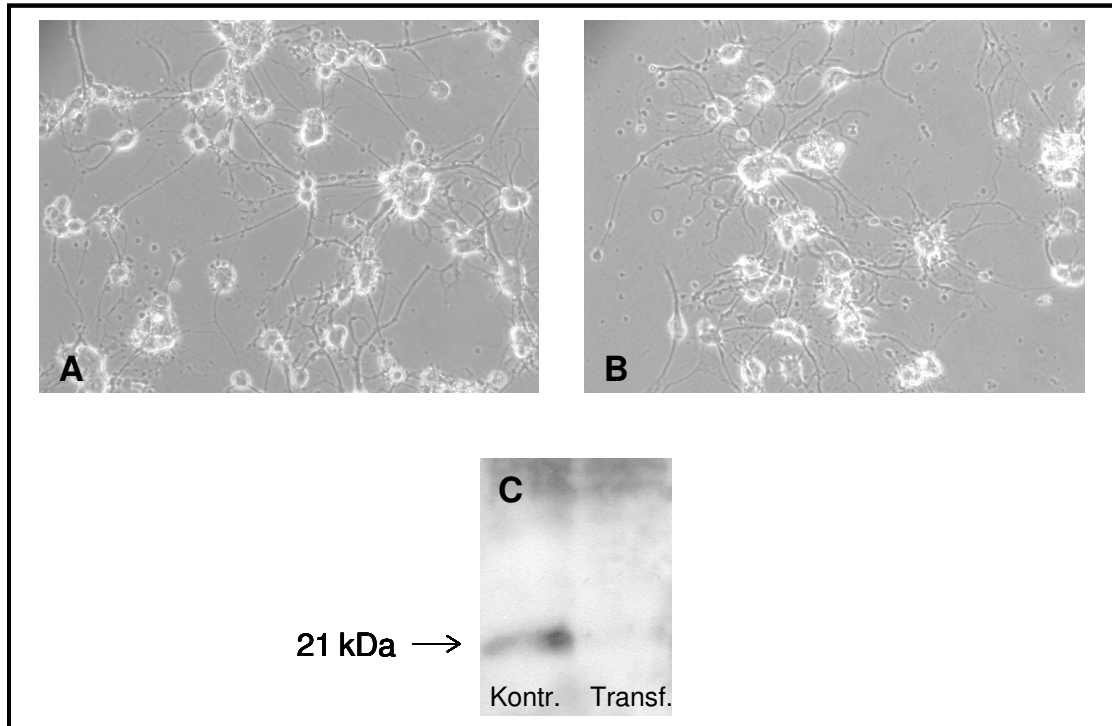
nicht über das Vorhandensein von Elmo2 in OL berichtet wurde, galt es zunächst zu zeigen, dass ein spezifischer Antikörper Elmo2 unter den oligodendroglialen Proteinen erkennt, und eine Interaktion mit RhoG in Schweine-OL erfolgen kann. Im Western Blot konnte das Vorhandensein von Elmo2 durch Auftreten einer Bande bei ~84 kDa gezeigt werden (Abb. 31 A). Für den Nachweis der GTP-gebundenen Form von RhoG durch Interaktion mit Elmo2 wurde der RhoG-Antikörper an ProteinA-Sepharose gekoppelt. Nach Inkubation mit dem Zelllysat wurden gebundene Proteine im anschließenden Western Blot hinsichtlich Elmo2 untersucht. Das Auftreten einer Bande bei ~84 kDa zeigte daher an RhoG-GTP gekoppeltes Elmo2. Unter Kontrollbedingungen ließ sich diese Interaktion nachweisen (Abb. 31 B). Nach Behandlung von OL mit Sst war jedoch keine Interaktion von RhoG mit Elmo2 nachweisbar (Abb. 31 C). Im Gegensatz zu RhoA führte Sst bei RhoG zu einer deutlichen Reduktion der aktivierten, GTP-gebundenen Form.



**Abb. 31: Interaktion von RhoG-GTP mit Elmo2 (84 kDa) im Western Blot.** A: Detektion von Elmo2 in Kontroll-OL (200 µg Protein). B+C: Darstellung der Interaktion von RhoG mit Elmo2, Detektion von Elmo2 im Western Blot (400 µg OL-Protein). Unter Kontrollbedingungen war eine Interaktion zwischen RhoG und Elmo2 nachweisbar (A). Die Behandlung mit Sst (5µM) für 72 h führte zu einer deutlichen Verminderung der RhoG-GTP Form, unter diesen Bedingungen war keine Interaktion zwischen RhoG und Elmo2 nachweisbar (C).

#### 4.2.5.3 Transfektion mit RhoG-siRNA

Zur Analyse des Einflusses von RhoG auf die oligodendrogliale Fortsatzbildung wurden OL mit entsprechender RhoG-siRNA transfiziert. 72 h nach Abschluss der Transfektion war morphologisch kein erkennbarer Unterschied zwischen Kontrollzellen und transfizierten OL zu sehen, ein Effekt auf die Fortsätze wurde nicht beobachtet (Abb. 32 A+B). Eine Analyse der Zellextrakte im Western Blot zeigte, dass die verwendete humane siRNA zu einem „knock-down“ von RhoG geführt hatte (Abb. 32 C).

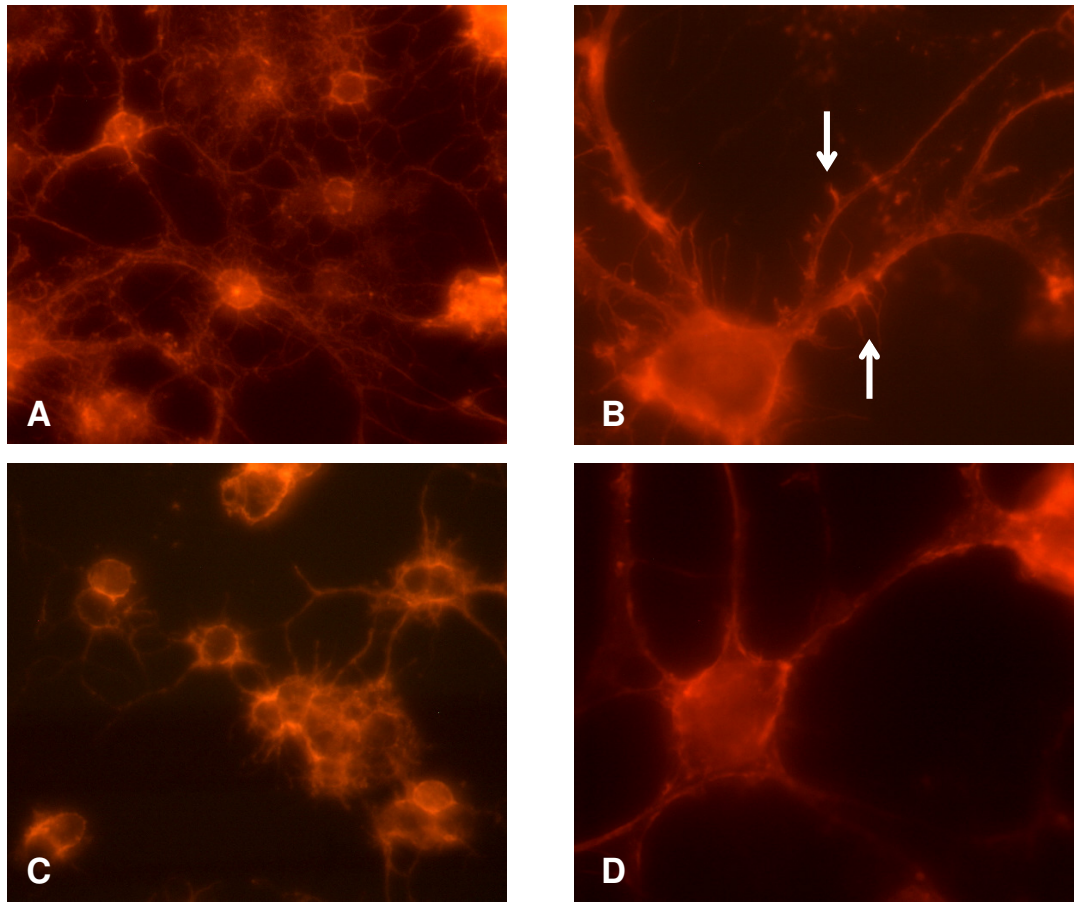


**Abb. 32: Transfektion von OL mit RhoG-siRNA.** OL (10 DIV) wurden für 6 h mit RhoG-siRNA transfiziert. 72 h nach Abschluss der Transfektion zeigten transfizierte OL (B) keine morphologischen Veränderungen gegenüber Kontroll-OL (A). Im Western Blot konnte RhoG (21kDa) nach Transfektion mit siRNA nicht mehr nachgewiesen werden (C). In jeder Spur wurden 40  $\mu$ g OL-Protein aufgetragen. A+B: phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung.

#### 4.2.6 Rac1 und Cdc42

Eine wichtige Funktion für den Auf- und Umbau des Aktin-Zytoskeletts und der damit verbundenen Fortsatzbildung in OL haben die Rho-Proteine Rac1 (Lamellipodien) und Cdc42 (Filopodien = „Mikrospikes“), sie können aber auch an der Aktivierung der stressinduzierten Proteinkinase (SAPK) beteiligt sein (COSO et al., 1995).

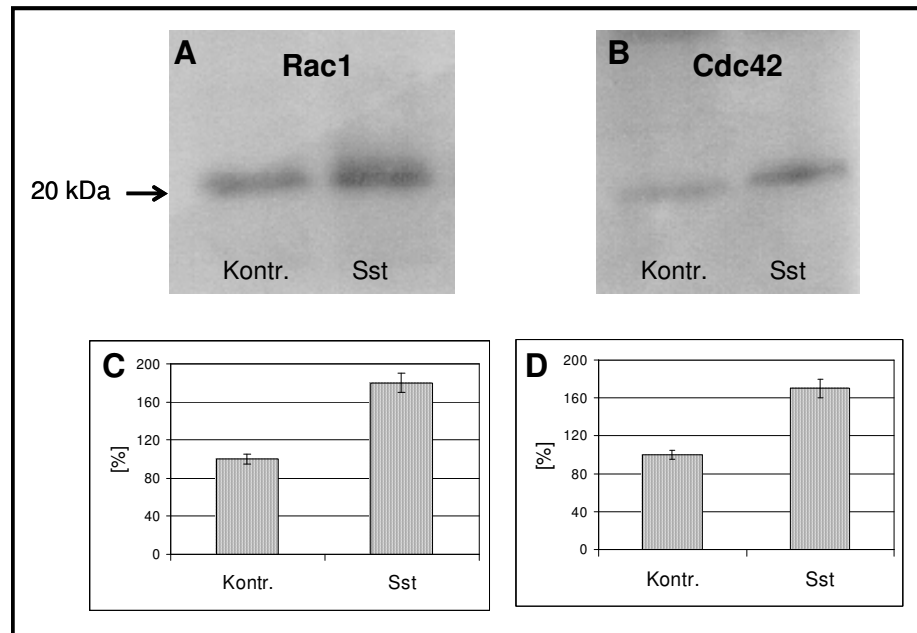
Eine immunzytochemische Färbung von Aktin erfolgte mit Rhodamin gekoppeltem Phalloidin, wodurch sich vorwiegend Mikrofilamente nachweisen ließen. Neben einem dichten Netzwerk von Fortsätzen waren auch über Mikrofilament gebildete „Mikrospikes“, Ausstülpungen mit einer Länge von 5-10  $\mu$ m, in Kontroll-OL sichtbar; sie sind für Verzweigungen der Fortsatzes verantwortlich (Abb. 33 B, Pfeile) (BRAY und CHAPMAN, 1985; SAHAI, 2002; RUMSBY et al., 2003). Nach Behandlung mit Sst für 48 h war eine erhebliche Abnahme des Verzweigungsgrades zu erkennen, „Mikrospikes“ fehlten völlig. Zudem war die Anzahl von Fortsätzen reduziert (Abb. 33 C+D).



**Abb. 33: Immunzytochemische Färbung von Aktin mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin.** A+B: Kontroll-OL (10 DIV) zeichneten sich durch ein dichtes verzweigtes Fortsatznetzwerk sowie die Bildung von „Mikrospikes“ (B, Pfeile) aus. Nach 48 h Sst (5  $\mu$ M) waren nur noch wenige, kaum verzweigte Fortsätze nachweisbar (C), „Mikrospikes“ fehlten vollständig (D). A+C: Aufnahmen der Fluoreszenz in 200facher Vergrößerung, B+D: Aufnahmen der Fluoreszenz in 400facher Vergrößerung.

Ob eine Reduktion von Anzahl und Verzweigungsgrad der Fortsätze sowie das Verschwinden von „Mikrospikes“ nach Sst-Behandlung mit einer verminderten Funktion von Rac1 und Cdc42 einhergeht, wurde über Aktivitätsassays untersucht. Für die Bestimmung des GTP-gebundenen Anteils der Proteine wurde analog zu III.4.2.1.4 ein Pull-Down-Assay verwendet, bei dem die Bindedomäne des jeweiligen Effektors, die Rac1-GTP bzw. Cdc42-GTP erkennt, als Fusionsprotein an Glutathion-Agarose-Beads gekoppelt war. Die Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) führte nach 72 h im Vergleich zu Kontroll-OL zu einem Anstieg der GTP-gebundenen Form von Rac1 um ~80 % (Abb. 34 A+C). Auch für Cdc42 war im Vergleich zu Kontroll-OL nach 72 h Sst ein Anstieg der aktivierten, GTP-gebundenen Form um ~70 % zu verzeichnen (Abb. 34 B+D).

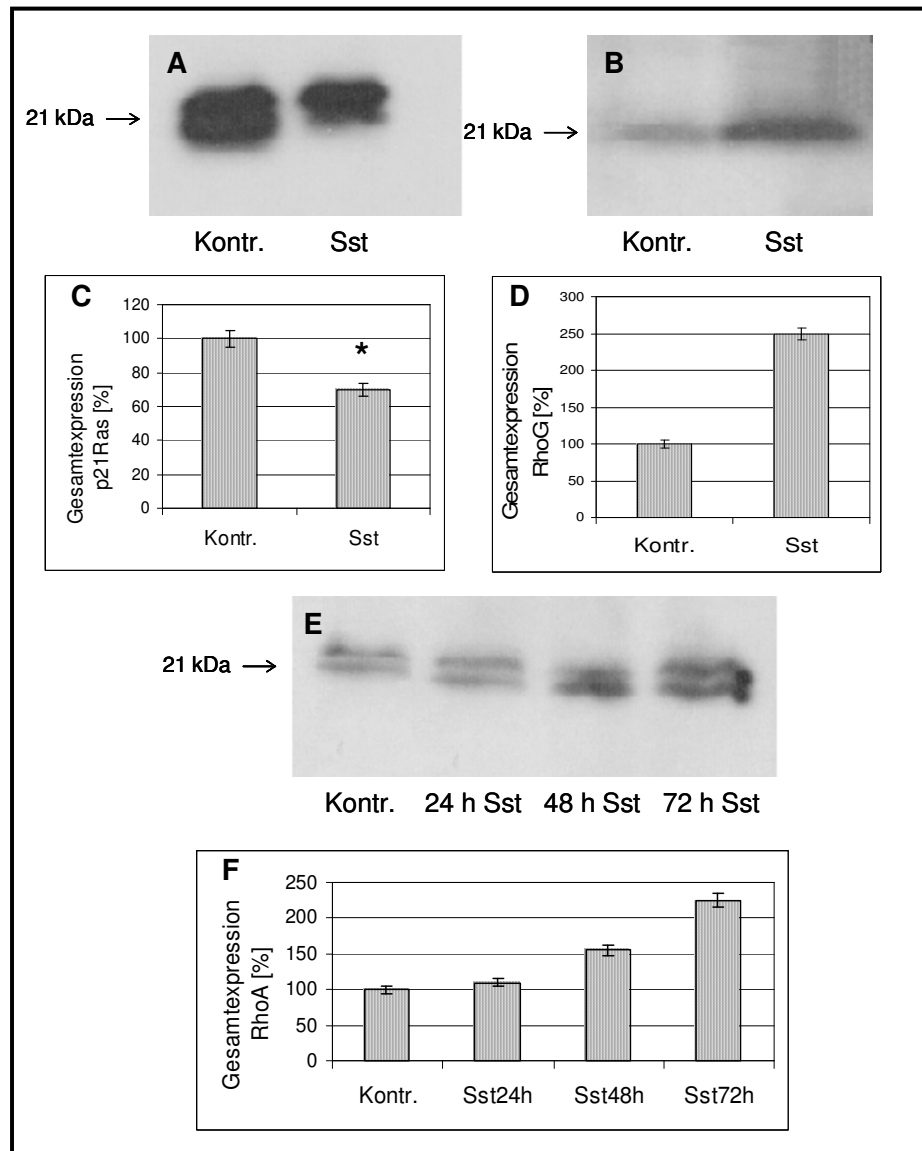




**Abb. 34: Bestimmung des Anteils an Rac1-GTP und Cdc42-GTP nach Behandlung mit Sst über Aktivitätsassay.** Die Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) für 72 h führte im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg der GTP-gebundenen Form von Rac1 um ~80 % (A+C). Der Anteil an GTP-gebundenem Cdc42 erhöhte sich gegenüber der Kontrolle um ~70 % (B+D). Für die Inkubation der Beads mit dem Zelllysate wurden jeweils 500  $\mu$ g OL-Protein eingesetzt. C+D: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

### 4.3 Expression von p21Ras, sowie RhoA und RhoG unter Sst

Unter III.4.1.1, III.4.2.1.1 und III.4.2.5.1 sind die Verteilungen von p21Ras, RhoA und RhoG in Membran und Zytosol nach Behandlung mit Sst im Vergleich zu Kontroll-OL dargestellt. Dabei war eine deutliche Verschiebung zur zytosolischen Fraktion erkennbar. Es stellte sich die Frage, ob sich Sst auch auf die Proteinexpression kleiner GTPasen auswirkt. Die Untersuchung der Proteinexpression von p21Ras, RhoA und RhoG ergab, dass es bei den Proteinen RhoA und RhoG infolge der Sst-Behandlung zu einem Anstieg der Expression auf mehr als das Doppelte im Vergleich zu Kontroll-OL kam, im Gegensatz dazu war die p21Ras-Proteinexpression nach 72 h Sst vermindert (Abb. 35).

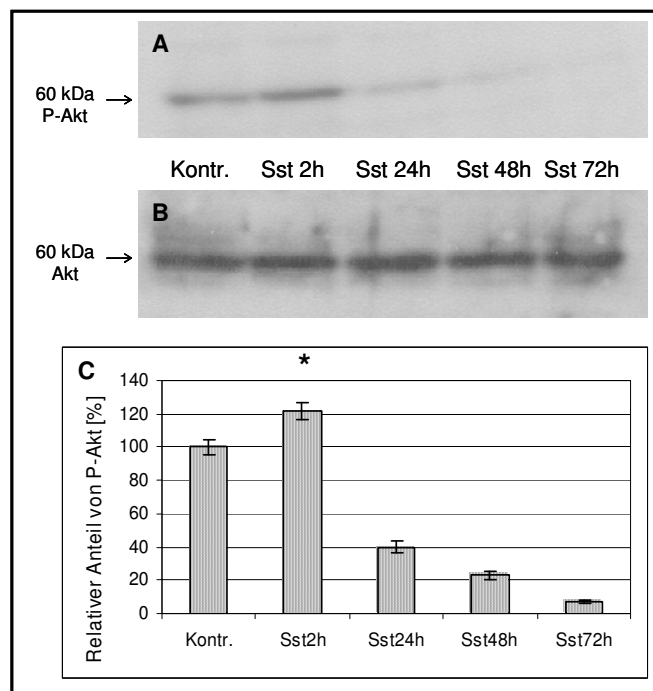


**Abb. 35: Darstellung der Gesamtexpression von p21Ras, RhoG und RhoA.** Nach Behandlung von OL mit Sst (5  $\mu$ M) für 72 h lag der Proteinlevel von p21Ras im Vergleich zur Kontrolle bei ca. 70 % ( $p < 0,001$ ) des unter Kontrollbedingungen exprimierten p21Ras Proteins (A, C) zu diesem Zeitpunkt war hingegen für RhoG sowie RhoA eine gesteigerte Expression nachweisbar. Die Expression von RhoG stieg nach 72 h Sst um 150 % gegenüber der Kontrolle an (B, D). Eine zeitlich abhängige Zunahme der Expression wurde exemplarisch für RhoA dargestellt (E); ein deutlicher Anstieg der Expression war dabei nach 48 h Sst nachweisbar, nach insgesamt 72 h Sst wurde im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung um 130 % gemessen (F). Für die Detektion von p21Ras wurden jeweils 25  $\mu$ g OL-Protein aufgetragen. Um RhoG und RhoA nachzuweisen, wurden jeweils 35  $\mu$ g OL-Protein eingesetzt. C, D, F: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot.

## 5. Phosphorylierung von Akt

Durch Überlebens- und Wachstumsfaktoren wie NGF kann die Serin / Threonin Protein-Kinase Akt (Protein-Kinase B, PKB), die in vier Isoformen vorkommt, aktiviert werden. Sie wirkt dem programmierten Zelltod entgegen (DATTA et al., 1999). In der Signalkaskade oberhalb von Akt steht PI3-Kinase, welche über Stimulation von Rezeptoren zur Plasmamembran rekrutiert und phosphoryliert wird. Dort katalysiert sie die Bildung der „Second Messenger“-Moleküle Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und Phosphatidyl-inositol(3,4,5)trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) durch Übertragung von Phosphat auf membranständiges Phosphoinositol. In Anwesenheit von PIP<sub>3</sub> kann das zur Plasmamembran rekrutierte Akt durch 3-Phosphoinositid-abhängige Protein-Kinasen (PDKs) oder eine Integrin-gekoppelte Kinase (ILK) aktiviert werden (ALESSI et al., 1997; DELCOMMENNE et al., 1998).

Ob Sst in Schweine-OL zu einer Aktivierung von Akt führt, wurde durch Analyse der Phosphorylierung der Kinase untersucht (Abb. 36). In Schweine-OL führte Sst (5 µM) nach 2 h zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Akt. Im weiteren Verlauf sank der Anteil bei gleichbleibender Expression von Akt unter das Kontrollniveau, bereits nach 24 h Sst waren im Vergleich dazu ca. 60 % weniger Phospho-Akt nachweisbar, nach weiteren 48 h war aktiviertes Akt kaum noch detektierbar.



**Abb. 36: Phosphorylierung von Akt nach Behandlung mit Sst.** Akt sowie Phospho-Akt konnten im Western Blot durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden, im SDS-Gel wurden in jeder Spur

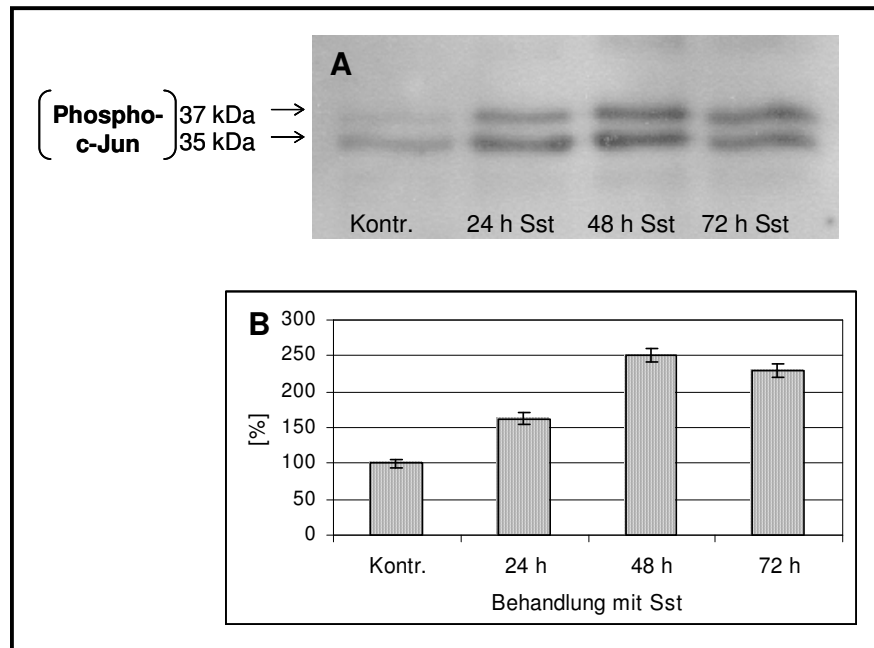
30 µg OL-Protein aufgetragen. A: Eine Behandlung von OL mit Sst (5 µM) führte nach 2 h zu einer signifikanten Aktivierung von Akt um ~20 % ( $p=0,003$ ). Im weiteren Verlauf sank die Aktivität unter das Kontrollniveau, nach 72 h war Phospho-Akt kaum noch nachweisbar. B: Vergleichend dazu wurde mit einem Antikörper gegen Akt die Gesamtexpression der Kinase nachgewiesen, die sich unter Sst nicht änderte. C: Für eine Darstellung der relativen Anteile an Phospho-Akt wurden die über Scion-Image quantifizierten Bandenintensitäten von Phospho-Akt und Akt ins Verhältnis gesetzt und mit der Kontrolle verglichen.

## 6. Aktivierung der SAPK/JNK

Die SAPK (oder auch Jun-N-terminale Kinase JNK) wird durch Umweltstress, zu dem u.a. UV-Strahlen, osmotischer Schock und inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$  zählen, aktiviert und leitet einen apoptotischen Signalweg ein (KYRIAKIS et al., 1994; XIA et al., 1995; MEIER et al., 1996). SAPK phosphoryliert c-Jun, eine Komponente des Transkriptionsfaktors AP-1 (DÉRIJARD et al., 1994; PAPAVALASSILOU et al., 1995). Neben dem Einfluss auf die Regulation von Strukturen des Zytoskeletts können Rac1, Cdc42 und RhoA auch an einer Induktion der SAPK beteiligt sein (COSO et al., 1995; MINDEN et al., 1995; MARINISSEN et al., 2004). Da die Behandlung mit Sst zu einem erhöhten GTP-gebundenen Anteil von Rac1 und Cdc42 führte, wurde mit Hilfe des SAPK/JNK-Aktivitätsassays untersucht, ob Sst neben einer Induktion von Caspase-3 den über SAPK/JNK laufenden apoptotischen Signalweg induziert.

Als Maß der SAPK-Aktivität galt in dem verwendeten Assay die Phosphorylierung von c-Jun, welche im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper durch Entstehen einer Bande bei ~35 kDa dargestellt werden konnte. Zum Auftreten einer zweiten Bande bei ~37 kDa kam es wahrscheinlich durch Erkennung von Jun-Isoformen oder unterschiedlichen c-Jun-Phosphorylierungsgraden (BUSCHMANN et al., 1998; POLLMANN et al., 2001). Zur Quantifizierung der Phosphorylierung von c-Jun wurden beide Banden einbezogen.

In Kontroll-OL konnte eine Basisaktivität festgestellt werden, die infolge einer Sst-Behandlung anstieg und nach 24 h bereits um ~60 % erhöht war (Abb. 37). Nach 48 h war der Anteil an phosphoryliertem c-Jun auf das 2,5fache gestiegen, nach weiteren 24 h auf das 2,3fache der Basisaktivität.



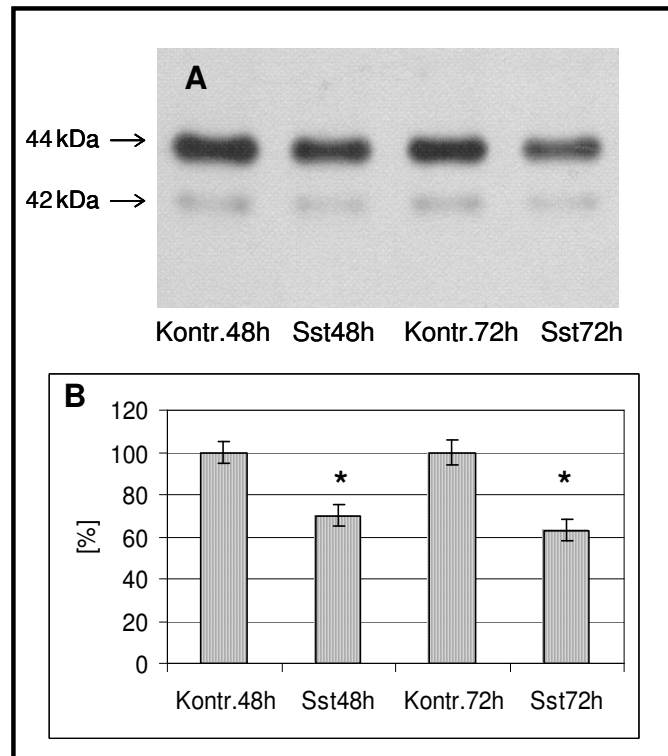
**Abb. 37: Aktivität der SAPK/JNK unter Sst.** Die Behandlung von OL mit Sst (5  $\mu$ M) führte zu einem Anstieg der in Kontrollzellen zu verzeichnenden Basisaktivität der SAPK. Mit einem Anstieg auf das 2,5fache der Kontrollaktivität war nach insgesamt 48 h das Maximum an phosphoryliertem c-Jun messbar. Weitere 24 h später sank der Wert wieder auf das 2,3fache des Basalwertes. A: SAPK-Aktivität über Darstellung der Phosphorylierung des Substrates c-Jun im Western Blot. Für die Inkubation mit dem an Agarose gekoppeltem Substrat wurden je Probe 500  $\mu$ g OL-Protein eingesetzt. B: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Western Blot unter Einbeziehung beider Banden.

## 7. ERK1/2-Aktivität unter Simvastatin

Die Stimulation von p21Ras führt u.a. zur Aktivierung des MAPK-Signalweges. So ist in OL die Aktivierung der MAPK ERK1/2 für das Auswachsen der oligodendrogialen Fortsätze von großer Bedeutung (STARHA and KIM, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NGF in der Lage ist, durch Autophosphorylierung von TrkA den p21Ras-MAPK-Signalweg und schließlich ERK1/2 zu aktivieren, was morphologisch mit einer gesteigerten Fortsatzbildung einhergeht (ALTHAUS et al., 1992; ALTHAUS et al., 1997).

Wurden OL mit Sst behandelt, kam es infolge der fehlenden Synthese von FPP zu einer verminderten Membranassoziation von p21Ras (s. III.4.1.1). Dies ging mit einer Verringerung der aktivierten, GTP-gebundenen Form von p21Ras einher (s. III.4.1.2). Da die Membranassoziation und Aktivierung von p21Ras essentielle Schritte zur Initiation des MAPK-Signalweges sind, wurde der Einfluss von Sst auf die Aktivität von ERK1/2 untersucht (Abb. 38). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität

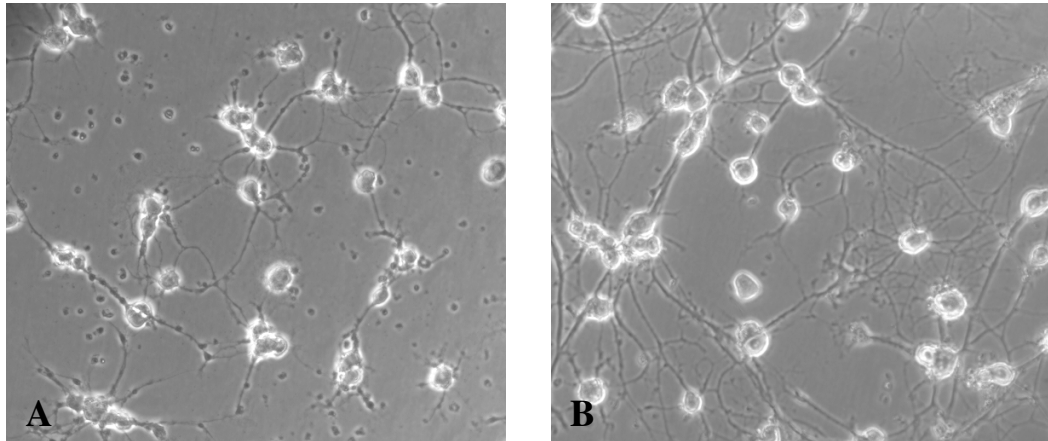
sowohl von ERK1, als auch ERK2 in OL nach Behandlung mit Sst im Vergleich zu Kontrollen reduziert war. Nach 72 h Sst ließen sich jeweils nur noch ~65 % der Kontrollaktivität nachweisen (Abb. 38 B).



**Abb. 38: Nachweis der Aktivität der MAPK ERK1/2 unter Kontrollbedingungen sowie nach Behandlung mit Sst im In-Gel-Kinase-Assay.** Die Aktivitäten von ERK2 (42 kDa) und ERK1 (44 kDa) ließen sich im Autoradiogramm durch Entstehen der unter A dargestellten Banden nachweisen. Die Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) führte nach 48 h zu einer Reduktion der Aktivität um ca. 30 % ( $p=0,014$ ). Nach weiteren 24 h Sst war die Aktivität im Vergleich zur Kontrolle um insgesamt ~35 % verringert ( $p=0,004$ ). Für die Auftrennung der Proben im SDS-Gel wurden in jeder Spur 8  $\mu$ g OL-Protein aufgetragen. B: Scion Image zur Quantifizierung der im Autoradiogramm dargestellten Banden unter Einbeziehung von ERK1 und ERK2.

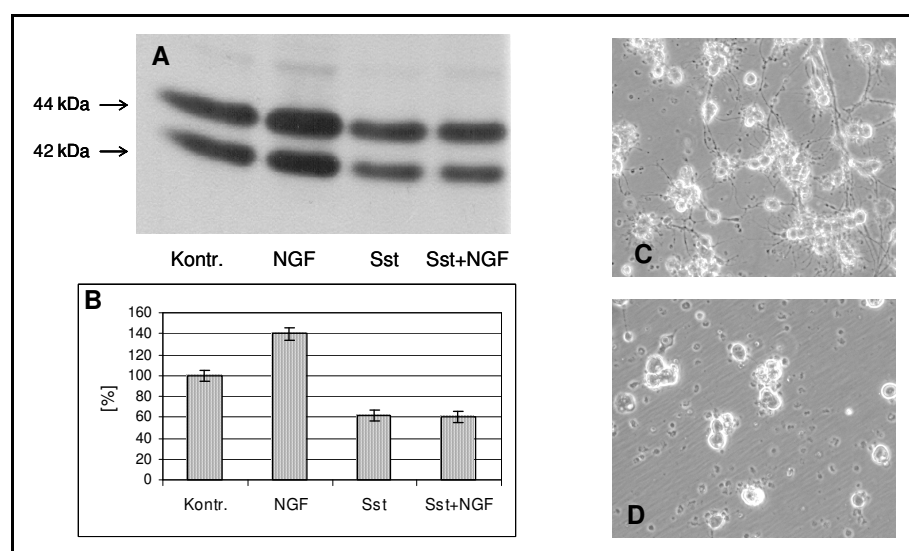
### 7.1 Einfluss von NGF $\pm$ Sst auf die Aktivität von ERK1/2

Wie bereits von ALTHAUS et al. (1992) gezeigt wurde, führte die Zugabe von NGF (100 ng/ml) zu OL-Kulturen nach 48-72 h morphologisch zu einer deutlich verstärkten Fortsatzbildung (Abb. 39 A+B).



**Abb. 39: Morphologische Effekte von NGF auf OL.** Die Zugabe von NGF (100 ng/ml) zu OL (10 DIV, A) führte bereits nach 48 h zu einer deutlich verstärkten Fortsatzbildung (B). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung.

Gleichzeitig war nach einem Zeitraum von 72 h eine Erhöhung der Aktivität von ERK1/2 um ca. 40 % messbar (Abb. 40 A+B, NGF), während Sst (5  $\mu$ M) innerhalb dieses Zeitraumes gegenüber der Kontrolle eine Reduktion der MAPK-Aktivität um ca. 40 % hervorrief (Abb. 40 A+B, Sst). Morphologisch führte die simultane Gabe von NGF und Sst zu keiner verbesserten Fortsatzbildung, im Gegenteil, vorhandene Fortsätze (Abb. 40, C) wurden retrahiert (Abb. 40 D). Eine infolge der Sst-Behandlung reduzierte ERK1/2-Aktivität konnte durch NGF nicht angehoben werden (Abb. 40 A+B, Sst+NGF).



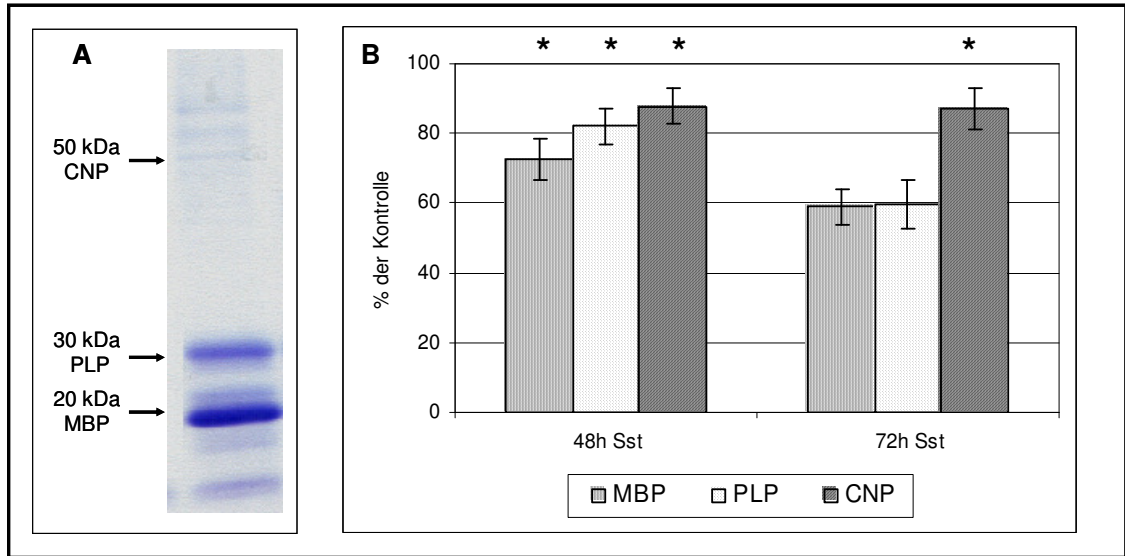
**Abb. 40: Aktivität der MAPK ERK1/2 unter NGF  $\pm$  Sst im In-Gel-Kinase-Assay.** Die Behandlung mit NGF (100 ng/ml) für 72 h führte in OL im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung der Aktivität

von ERK1/2 um ca. 40 % (A+B); unter Sst (5  $\mu$ M) war die MAPK-Aktivität nach 72 h im Vergleich zur Kontrolle um ca. 40 % vermindert (A+B). Diese Reduktion konnte durch gleichzeitige Gabe von NGF (100 ng/ml) nicht kompensiert werden, OL zeigten im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine um 40 % verringerte Aktivität (A+B) und eine, gegenüber Kontroll-OL (C), für Sst typische Fortsatzretraktion (D). Bei der Auftrennung im SDS-Gel wurden für jede Probe 10  $\mu$ g OL-Protein eingesetzt. B: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Autoradiogramm unter Einbeziehung von ERK1 und ERK2.

## 8. Synthese von Myelinproteinen unter Simvastatin

Eine Aktivierung der MAPK ERK1/2 führt in OL u.a. zu einer Aktivierung der Transkription von Myelinproteingenen. Unter III.7. konnte gezeigt werden, dass Sst zu einer Reduktion der Aktivität von ERK1/2 führte. Folglich war von Interesse, ob Sst die Synthese von Myelinproteinen wie MBP, PLP und CNP beeinflusst. Dies wurde mittels Einbau von radioaktiv markiertem  $^{14}$ C-Leucin untersucht. Für eine eindeutige Zuordnung der im Autoradiogramm aufgetretenen Banden wurde aus der weißen Substanz des Schweinehirns Myelin isoliert, dessen im SDS-Gel aufgetrennte Proteine bereits früher mit spezifischen Antikörpern und hier durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue dargestellt wurden (Abb. 41 A). PLP lief dabei, wie bekannt, etwas schneller als es seinem MW von 30 kDa entsprach. Eine Zuordnung der im Autoradiogramm sichtbaren Banden zu den Myelinproteinen ergab, dass die Behandlung mit Sst nach 48 h zu einer Reduktion der neu synthetisierten Myelinproteine führte. Nach insgesamt 72 h Sst waren die Anteile an neu synthetisiertem MBP und PLP im Vergleich zur Kontrolle um jeweils ca. 40 % reduziert. Der Anteil an neu gebildetem CNP war zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle um ca. 15 % reduziert (Abb. 41 B).





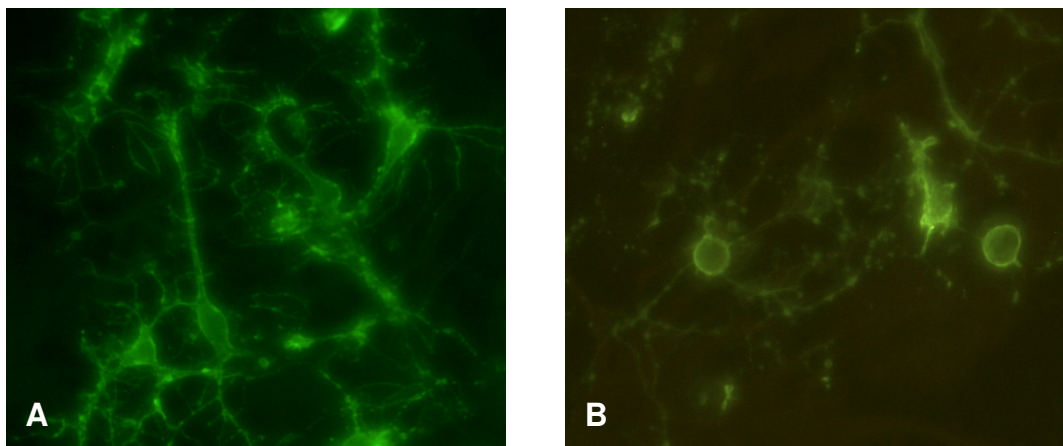
**Abb. 41: Neusynthese der Myelinproteine MBP, PLP und CNP in OL nach Behandlung mit Sst.** A: Für die Darstellung der Myelinproteine MBP, PLP und CNP wurden 50 µg Protein aus isoliertem Schweinemyelin im SDS-Gel aufgetrennt und im Anschluss mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. B: Der Nachweis neu synthetisierter Myelinproteine unter Sst erfolgte über Einbau von radioaktiv markiertem  $^{14}\text{C}$ -Leucin und Quantifizierung der Myelinproteinbanden des Autoradiogramms über Scion Image. Die Behandlung mit Sst (5 µM) führte bereits nach 48 h zu einer im Vergleich zur Kontrolle verminderten Neusynthese von Myelinproteinen. Nach insgesamt 72 h Sst exprimierten die Zellen ca. 40 % weniger MBP und PLP sowie ca. 15 % weniger CNP als entsprechende Kontrollen. Bei der Auftrennung im SDS-Gel wurden jeweils 50 µg OL-Protein eingesetzt.

## 9. Morphologische und biochemische Effekte von Simvastatin auf kultivierte Mäuse-Oligodendrozyten

Da die in dieser Arbeit geplanten *in vivo* Versuche an C57BL/6N Mäusen durchgeführt werden sollten, galt es sicherzustellen, dass durch Sst ausgelöste Effekte in Mäuse-OL mit denen von Schweine-OL vergleichbar sind. Dies war insofern von Interesse, da bei bestimmten Mäusestämmen *in vivo* infolge einer Behandlung mit Sst von einer Hochregulation der mRNA für HMG-CoA Reduktase berichtet wurde (THELEN et al., 2006). Daher erfolgte vor Beginn der *in vivo* Experimente zunächst eine Untersuchung des Einflusses von Sst auf kultivierte Mäuse-OL des Stammes C57BL/6N. Als Vergleichskriterien wurden Auswirkungen von Sst auf die Morphologie von OL, die Cholesterinsynthese sowie die Aktivität der MAPK herangezogen.

### 9.1 Morphologie kultivierter Mäuse-OL unter Sst

Für die Kultivierung von Mäuse-OL wurde das zerkleinerte Material des Mittelhirns sowie der Hemisphären von Mäuseembryonen des Alters E15-E17 in Kultur gebracht. Die Selektion der OL erfolgte nach „Neuronenkill“ sowie Entfernung der Makrophagen durch Abschütteln (SIMONS et al., 2000). OL-Kulturen waren nach diesen Selektionsschritten jedoch weiterhin durch das Auftreten von Fremdzellen gekennzeichnet. Um die morphologischen Effekte von Sst auf Mäuse-OL zu untersuchen, wurde deshalb eine immunzytochemische Färbung mit MOSP vor und nach Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) zur spezifischen Markierung von OL durchgeführt (Abb. 42). Wie bei Schweine-OL führte die Behandlung mit Sst in Mäuse-OL nach 72 h zu einer deutlichen Fortsatzretraktion, die vom Abkugeln der Zellen und deren Ablösen vom Boden der Kulturschale gefolgt war. Diese Effekte waren ebenfalls ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M Sst erkennbar.

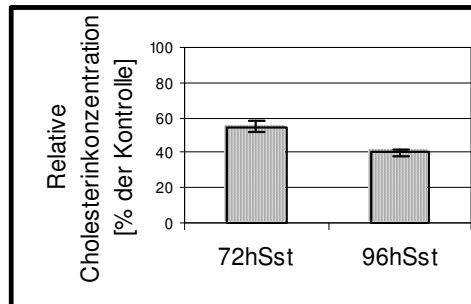


**Abb. 42: Immunzytochemische Färbung mit MOSP zur Darstellung der Fortsatzretraktion kultivierter Mäuse-OL nach Zugabe von Sst.** Kultivierte Mäuse-OL zeichneten sich wie Schweine-OL durch die Entwicklung von verzweigten Fortsätzen aus (A, 14 DIV). Die Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) führte nach 72 h ebenfalls zur Retraktion gebildeter Fortsätze (B), gefolgt vom Abkugeln der Zellen sowie Ablösen vom Boden der Kulturschale. A+B: Aufnahmen der Fluoreszenz in 200facher Vergrößerung.

### 9.2 Hemmung der Cholesterinsynthese in Mäuse-OL durch Sst

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die *in vivo* Untersuchungen war die inhibitorische Wirkung von Sst auf die HMG-CoA Reduktase, die zu einem messbar sinkenden Cholesteringehalt führen sollte. Eine deutliche Abnahme des

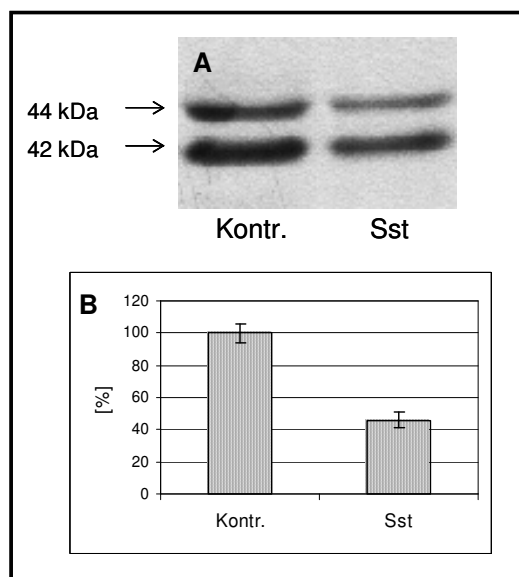
oligodendroglialen Cholesteringehaltes durch Sst konnte im Gegensatz zu Schweine-OL bereits nach 72 h gemessen werden (Abb. 43). Unter Kontrollbedingungen betrug der Cholesteringehalt etwa 35-45  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein. Nach insgesamt 96 h war der Wert im Vergleich zur Kontrolle um ca. 60 % gesunken.



**Abb. 43: Messung des oligodendroglialen Cholesteringehaltes.** Die Behandlung von Mäuse-OL mit Sst (5  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer Reduktion des Cholesterinspiegels um ca. 45 % nach 72 h sowie um ca. 60 % nach 96 h.

### 9.3 Aktivität von ERK1/2

Bei Schweine-OL war infolge der Sst-Behandlung die Aktivität von ERK1/2 reduziert (s. III.7). Auch bei Mäuse-OL führte die Behandlung mit Sst (5  $\mu\text{M}$ ) nach 72 h zu einer deutlichen Reduktion der ERK1/2-Aktivität um ca. 55 % (Abb. 44).



**Abb. 44: Nachweis der Aktivität von ERK1/2 in Mäuse-OL unter Sst über In-Gel-Kinase-Assay.** Die Aktivitäten von ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa) ließen sich im Autoradiogramm durch

Entstehen der unter (A) dargestellten Banden nachweisen. Die Behandlung mit Sst (5  $\mu$ M) führte zu einer Reduktion der Aktivität von ERK1/2 um ca. 55 %. B: Scion Image zur Quantifizierung der Banden im Autoradiogramm. Bei der Auftrennung im SDS-Gel wurden jeweils 10  $\mu$ g OL-Protein eingesetzt.

## 10. In vivo Untersuchungen

### 10.1 Cuprizin-Behandlung und Applikation von Sst

Zur in vivo Untersuchung, ob Sst eine Remyelinisierung hemmt oder verzögert, wurde das Cuprizin-Modell verwendet (MATSUSHIMA und MORELL, 2001). Dabei kommt es bei C57BL/6N-Mäusen nach einer 6-wöchigen Cuprizin-Diät zu einer reproduzierbaren Entmarkung vorwiegend im Bereich des corpus callosum (SUN et al., 2006). Das Absetzen von Cuprizin führt zu einer spontanen Remyelinisierung. Dieses Modell hat gegenüber einer Demyelinisierung bei EAE den Vorteil, dass weniger immunologisch wirksame Komponenten beteiligt sind.

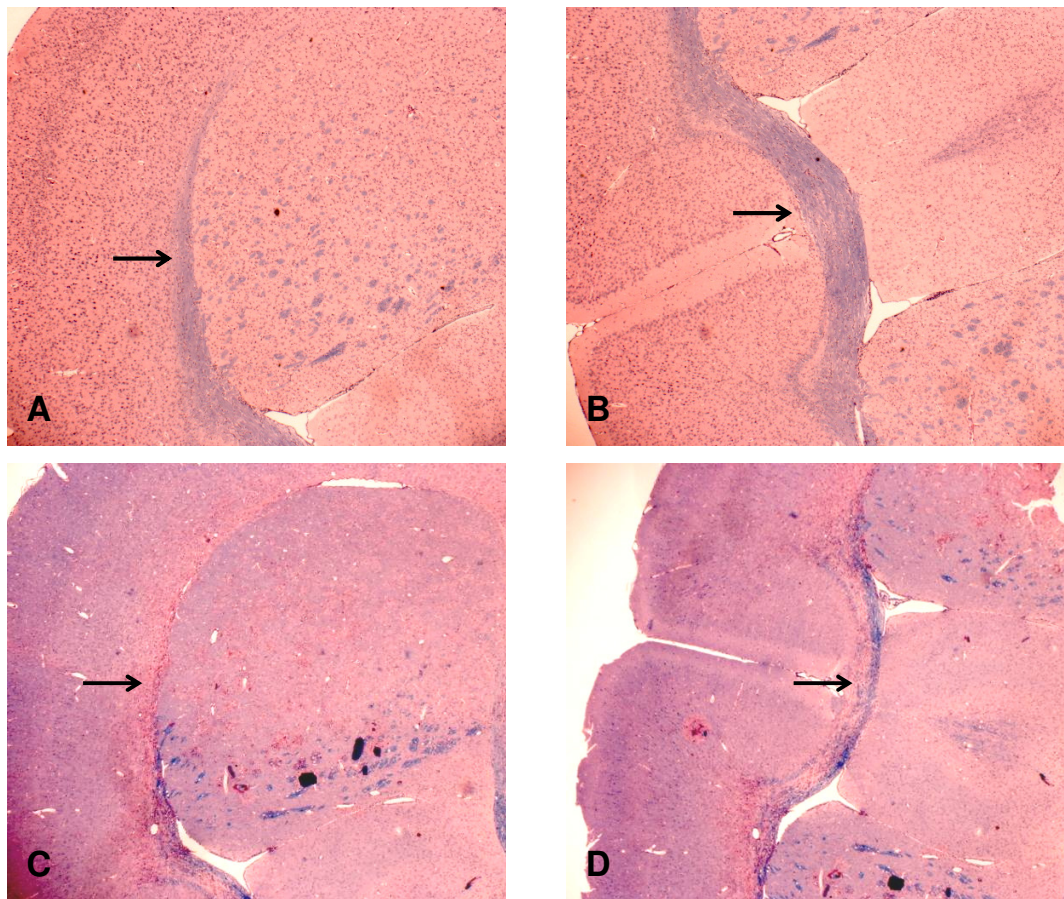
Nach der Eingewöhnungsphase der Tiere und bei Erreichen eines Gewichtes von ca. 15 g / Tier konnte mit der Cuprizin-Diät begonnen werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere 6 Wochen alt. Während einer folgenden 6-wöchigen Diät wurde einmal pro Woche das Gewicht der Tiere bestimmt. Nach 2-3 Wochen Cuprizin war bei den Tieren ein Gewichtsverlust von durchschnittlich 10-15 % zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf war wieder eine Gewichtszunahme erkennbar, so dass die Tiere nach 6 Wochen Cuprizin wieder mindestens ihr Ausgangsgewicht erreicht hatten. Bei den meisten Gruppen war eine Gewichtszunahme um 5-10 % gegenüber dem Startzeitpunkt der Cuprizin-Diät zu verzeichnen. Im Vergleich dazu war bei gleichaltrigen Tieren, die kein Cuprizin bekamen („age-matched“ Kontrollen), innerhalb der 6 Wochen eine Gewichtszunahme von 15 % zu verzeichnen. Neurologische Auffälligkeiten durch Behandlung mit Cuprizin ließen sich bei einer Inspektion der Tiere nicht feststellen. Auf eine Analyse motorischer Defizite, die über den MOSS- („motor skill sequence“) Test nachweisbar wären, wurde verzichtet (LIEBETANZ und MERKLER, 2006).

Für die tägliche Menge Sst-Suspension per Schlundsondierung wurde einmal pro Woche das Gewicht der Tiere kontrolliert und die Dosierung (s. III.10.3) entsprechend den durchschnittlichen Gewichten der Gruppen angepasst. Dabei wurden die Konzentrationen der Sst-Suspensionen so gewählt, dass das zu applizierende Volumen zwischen 400-500  $\mu$ l lag.

## 10.2 Demyelinisierung nach Behandlung mit Cuprizin

### 10.2.1 Demyelinisierung unter Cuprizin – LFB-PAS

Die Behandlung mit Cuprizin (0,2 %, w/v, gemischt in Pulverfutter) für 6 Wochen führte zu einer signifikanten Entmarkung hauptsächlich im Bereich des corpus callosum. Die Darstellung von Myelin erfolgte über LFB-PAS-Färbung. Zur Bewertung einer im Vergleich zu „age-matched“ Kontrollen (Abb. 45 A+B) stattgefundenen Demyelinisierung wurde die Schnittebene der Objekte so gewählt, dass die medialen und lateralen Bereiche des corpus callosum ausgewertet werden konnten. Dabei waren im medialen Bereich auch nach 6 Wochen Cuprizin meist noch Reste von Myelin erkennbar (Abb. 45 D). Die lateralen Bereiche waren hingegen bei allen Tieren nahezu komplett entmarkt (Abb. 45 C). Eine geblindete Auswertung des durch LFB-PAS erkennbaren Stadiums der Demyelinisierung erfolgte daher über die lateralen Bereiche.



**Abb. 45: LFB-PAS Färbung zur Darstellung von Myelin in „age-matched“ Kontrollen und Cuprizin behandelten Tieren.** In „age-matched“ Kontrollen war Myelin sowohl im lateralen (A) als auch medialen (B) Bereich des corpus callosum als breiter Streifen erkennbar. Behandelte man die Tiere für 6 Wochen mit Cuprizin, führte dies zu einer deutlichen Demyelinisierung sowohl im lateralen (C), als

auch medialen (D) Bereich des corpus callosum. Während es im lateralen Bereich zu einer nahezu vollständigen Demyelinisierung kam, war im medialen Bereich noch „Rest-Myelin“ erkennbar. Lichtmikroskopische Aufnahmen in 25facher Vergrößerung.

### 10.2.2 Demyelinisierung unter Cuprizone – TEM

Für die elektronenmikroskopische Darstellung in einer zweiten Versuchsreihe erfolgte die Erfassung der Demyelinisierung aus technischen Gründen im Bereich des medialen Teiles des corpus callosum. Die Schnittebene der Präparate wurde so gewählt, dass die Axone des corpus callosum mit ihren zugehörigen Myelinschichten möglichst im Querschnitt sichtbar waren (Abb. 46 A+B). Dies erlaubte das genaue Vermessen des Durchmessers der Axone sowie der Dicke der dazugehörigen Myelinschichten.

Analog III.10.2.1 war bei den Tieren nach 6 Wochen Cuprizone eine deutliche Demyelinisierung erkennbar (Abb. 46 C+D). Daneben konnte man aber auch noch einzelne myelinisierte Axone sehen.

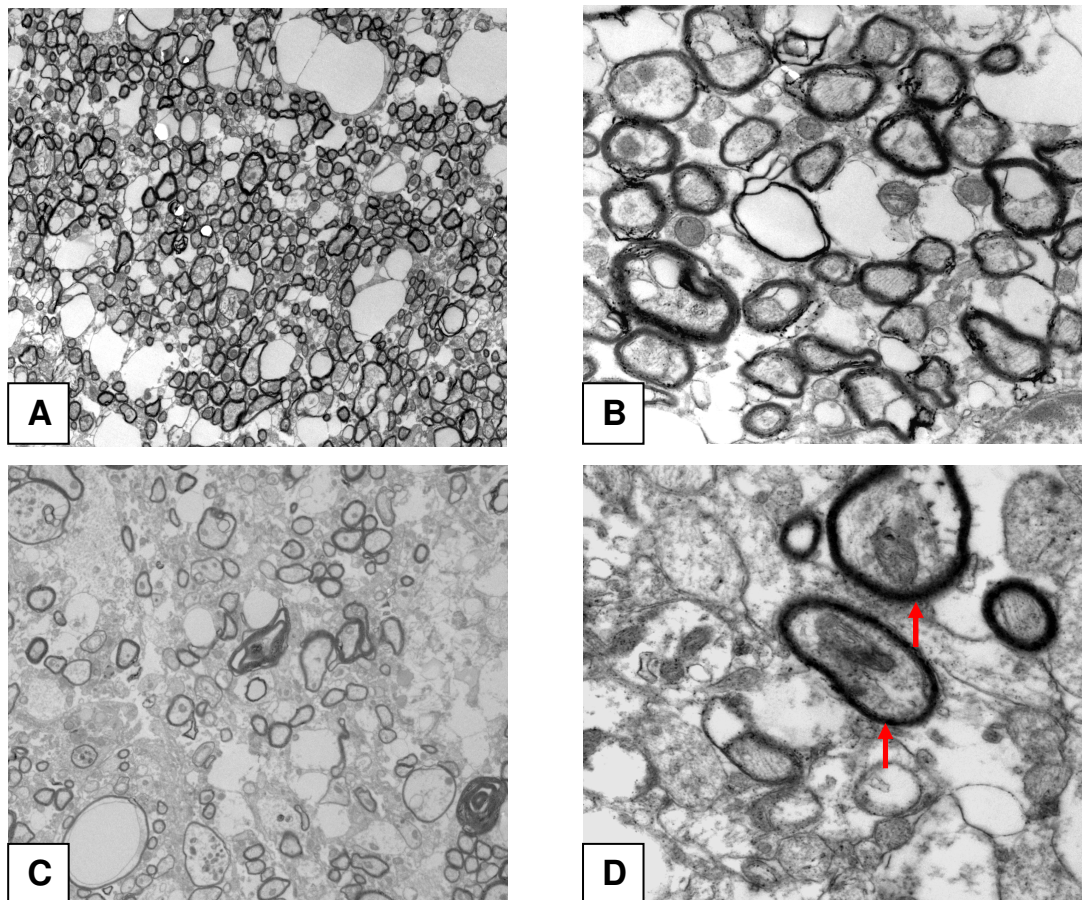


Abb. 46: Elektronenmikroskopische Darstellung des corpus callosum von „age-matched“ Kontrollen und Cuprizone-behandelten Tieren. A+B: Bei Kontrolltieren waren nahezu alle Axone

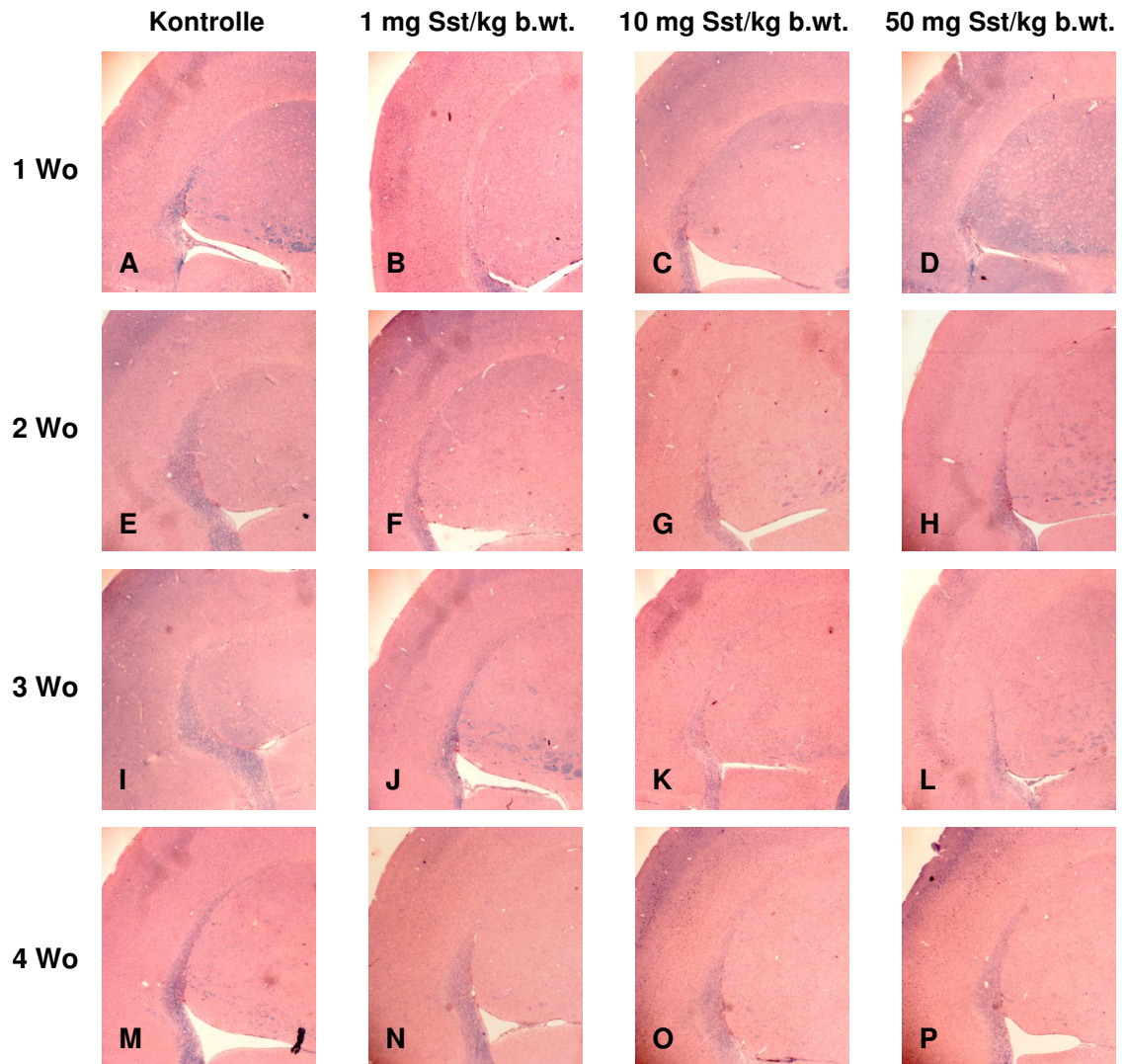
myelinisiert. C+D: Die Behandlung mit Cuprizone führte nach 6 Wochen zu einer signifikanten Demyelinisierung, nur wenige myelinisierte Axone waren zu diesem Zeitpunkt noch erkennbar (rote Pfeile). A+C: 4.000fache Vergrößerung, B+D: 20.000fache Vergrößerung

### **10.3 Remyelinisierung nach Absetzen von Cuprizone und Behandlung mit Sst**

#### **10.3.1 Remyelinisierung unter Sst – LFB-PAS**

In einer ersten Versuchsserie wurden Tiere nach Absetzen von Cuprizone mit 1 mg, 10 mg sowie 50 mg Sst/kg b.wt. für 1, 2, 3 und 4 Wochen behandelt.

Da, wie in Abb. 45 C und D dargestellt, nach 6 Wochen Cuprizone im Gegensatz zum medialen Bereich eine nahezu komplette Entmarkung des lateralen Bereiches des corpus callosum sichtbar war, erschien eine geblindete Beurteilung der Remyelinisierung unter Sst anhand des lateralen Bereiches als besser geeignet. Erste Anzeichen einer Remyelinisierung zeigten sich in Kontrollen 2 Wochen nach Absetzen von Cuprizone (Abb. 47 E, Vergleich: Abb. 45 C, 6 Wochen Cuprizone). Bereits zu diesem Zeitpunkt war ein Unterschied zu Sst-behandelten Tieren sichtbar, die zwar auch Anzeichen einer Remyelinisierung aufwiesen, jedoch deutlich weniger ausgeprägt (Abb. 47 F-H). Im weiteren Verlauf remyelinisierten Sst-behandelte Tiere weiterhin verzögert, so dass zu jedem Zeitpunkt ein deutlicher Unterschied gegenüber Kontrollen, die nach Absetzen von Cuprizone kein Sst bekamen, zu verzeichnen war. 4 Wochen nach Absetzen von Cuprizone war eine weit fortgeschrittene Remyelinisierung bei diesen Kontrolltieren sichtbar (Abb. 47 M). Unter allen Sst-Konzentrationen konnte kein Tier in dem Maße wie die Kontrolle remyelinisieren (Abb. 47 N-P).



**Abb. 47: Remyelinisierung nach Absetzen von Cuprizone in Kontrolltieren und nach Behandlung mit Sst über LFB-PAS.** 1 Woche nach Absetzen von Cuprizone war bei keinem Tier eine deutliche Remyelinisierung nachweisbar (A-D). Unter normalem Futter (Kontrollbedingungen) begannen die Tiere 2 Wochen nach Absetzen von Cuprizone mit einer über LFB-PAS darstellbaren Remyelinisierung (E), die sich im weiteren Verlauf fortsetzte (I) und nach 4 Wochen weit vorangeschritten war (M). Im Gegensatz dazu führte die 2-wöchige Behandlung mit verschiedenen Sst-Konzentrationen zu einer deutlichen Hemmung des Remyelinisierungsprozesses (F-H). Im weiteren Verlauf fand eine Remyelinisierung statt, die jedoch zu allen Zeitpunkten gegenüber den Kontrolltieren verzögert war (J-L, N-P). Lichtmikroskopische Aufnahmen in 20facher Vergrößerung.

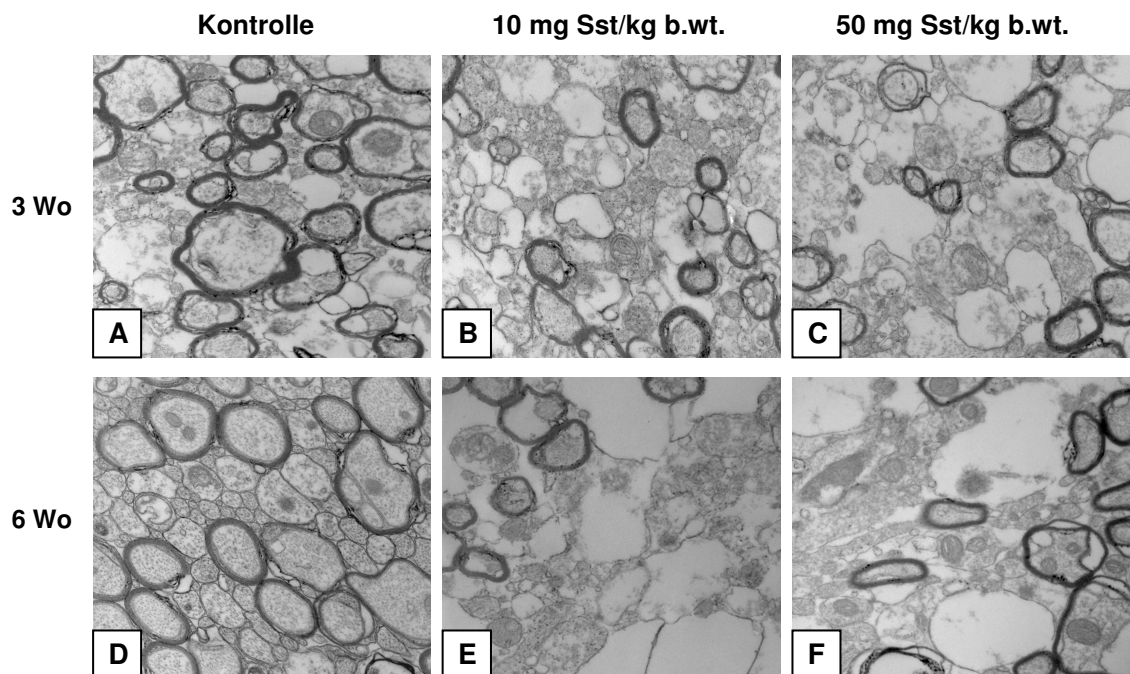
### 10.3.2 Remyelinisierung unter Sst – TEM

Die Zeiträume der Sst-Applikation für eine elektronenmikroskopische Darstellung der Remyelinisierung wurden in Anlehnung an Ergebnisse der ersten, LFB-PAS gefärbten Serie modifiziert. Der Behandlungszeitraum wurde auf 6 Wochen ausgedehnt, ein



Zwischenresultat ebenfalls nach 3 Wochen aufgenommen, und die Sst-Konzentrationen auf 10 mg/kg b.wt. und 50 mg/kg b.wt. festgesetzt.

3 Wochen nach Absetzen von Cuprizone waren im Vergleich zu Abb. 46 D (6 Wochen Cuprizone) wieder mehr bemerkte Axone sichtbar (Abb. 48 A). Im Gegensatz dazu konnte man unter beiden Sst-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt weniger bemerkte Axone sehen, was eine Hemmung der Remyelinisierung implizierte (Abb. 48 B, C). Auch nach 6 Wochen war die Wiederbemarkung gegenüber Kontrollen, die kein Sst bekamen (Abb. 48 D), deutlich verzögert. In Abb. 48 sind für die jeweilige Gruppe exemplarische Ausschnitte der ausgewerteten Bereiche (s. III.10.4.2) dargestellt.



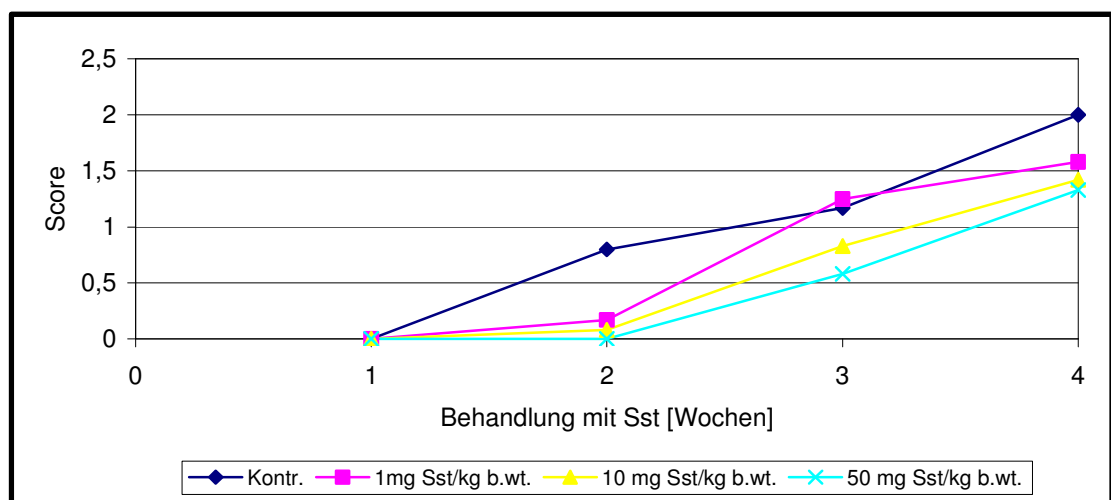
**Abb. 48: Remyelinisierung nach Absetzen von Cuprizone und Behandlung mit Sst.** 3 Wochen nach Absetzen von Cuprizone war im TEM in Kontrollen eine Zunahme der Anzahl bemerkter Axone sichtbar (A). Unter Sst dagegen war die Remyelinisierung weniger ausgeprägt (B+C). Diese Tendenz setzte sich fort: nach 6 Wochen Sst-Behandlung war die Anzahl bemerkter Axone im Vergleich zu Kontrollen (D), die eine zunehmende Remyelinisierung zeigten, deutlich geringer (E+F). Elektronenmikroskopische Aufnahmen in 20.000facher Vergrößerung.

## 10.4 Evaluation der De- und Remyelinisierung – LFB-PAS und TEM

### 10.4.1 LFB-PAS

Zur Quantifizierung der De- bzw. Remyelinisierung durch 3 geblindete Untersucher wurden die lateralen Bereiche des corpus callosum aller Tiere bewertet (HIREMATH et

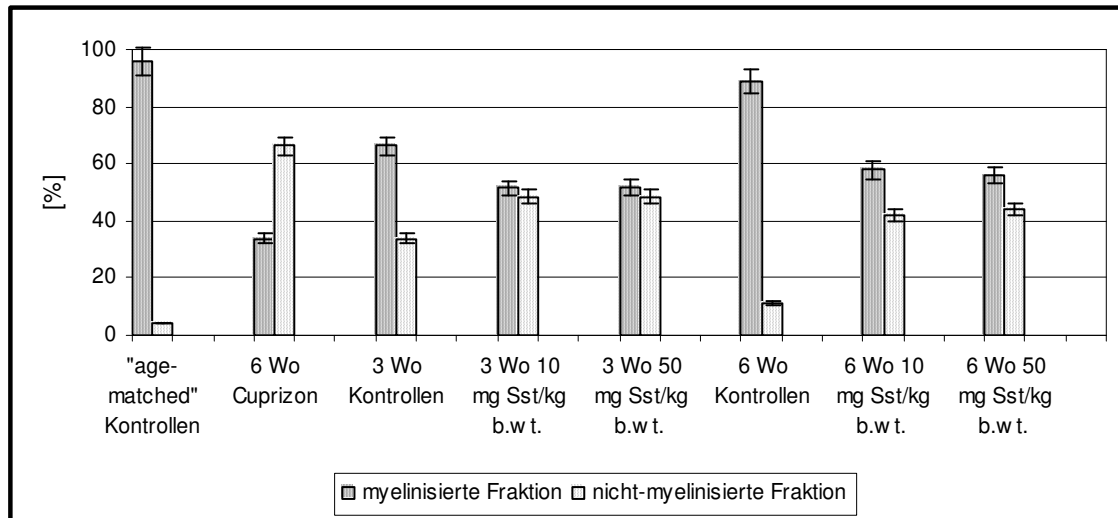
al., 1998; COPRAY et al., 2005). Die Einteilung wurde so gewählt, dass Score 0 für eine komplette Demyelinisierung und 3 für eine komplette (Re)Myelinisierung stand (Abb. 49). Zum Zeitpunkt des Absetzens von Cuprizon hatten alle Tiere einen Score von 0. Bereits zwei Wochen später verbesserte sich dieser Wert bei Kontrolltieren, die kein Sst bekamen, auf 0,8. Sst-behandelte Tiere hingegen zeigten kaum eine Remyelinisierung und verbesserten sich vom Score 0 auf einen Wert von 0,17 (1 mg Sst/kg b.wt.) bzw. 0,08 (10 mg Sst/kg b.wt.), bei einer Konzentration von 50 mg Sst/kg b.wt. waren keine Anzeichen einer Remyelinisierung erkennbar (Score 0). 4 Wochen nach Absetzen von Cuprizon war die Remyelinisierung ohne Sst in Kontrollen weiter fortgeschritten, die Tiere erreichten einen Score von 2. Sst-behandelte Tiere dagegen zeigten zu diesem Zeitpunkt zwar eine Remyelinisierung, diese war jedoch im Vergleich zur Kontrolle weiterhin vermindert. In Abhängigkeit von der Sst-Konzentration erreichten die Tiere nur einen Wert von 1,58 (1 mg/kg b.wt.), 1,42 (10 mg/kg b.wt.) und 1,33 (50 mg/kg b.wt.).



**Abb. 49 Bestimmung der De-/ und Remyelinisierungs-Scores der lateralen Bereiche des corpus callosum nach Absetzen von Cuprizon und Behandlung mit Sst.** Erste Anzeichen einer Remyelinisierung waren bei den Kontrolltieren 2 Wochen nach Absetzen von Cuprizon sichtbar. Der Score dieser Gruppe verbesserte sich in den folgenden 2 Wochen auf einen Wert von 2. Die Behandlung mit Sst führte zu einer Verzögerung der Remyelinisierung. Die Tiere erreichten nach 4-wöchiger Behandlung nur einen Wert von 1,58 (1 mg Sst/kg b.wt.), 1,42 (10 mg Sst/kg b.wt.) und 1,33 (50 mg Sst/kg b.wt.).

### 10.4.2 TEM

Zur Quantifizierung der De- und Remyelinisierung in den elektronenmikroskopischen Abbildungen wurden im corpus callosum nackte versus bemarkte Axone gezählt sowie der Durchmesser von Axonen und die Dicke der dazugehörigen Myelinschichten bestimmt. Auf diese Art wurden pro Tier etwa 800-1000 Axone und die dazugehörigen Myelinschichten vermessen. Unter den angewandten Fixierungsmethoden, bei denen das betrachtete Präparat gegenüber dem lebendigen Gewebe geschrumpft war, betrug die durchschnittliche Dicke einer axonalen Plasmamembran ~15 nm (MERKLER, mündliche Mitteilung). Daher galt eine Schichtdicke von mehr als 15 nm als myelinisiert, und eine von  $\leq 15$  nm als nicht-myelinisiert. Ebenfalls von Bedeutung für eine Berechnung der myelinisierten und unbemarkten Fraktion war die Axongröße, da auch in „age-matched“ Kontrollen unbemarkte Axone zu finden sind, wobei diese meist einen kleinen Durchmesser haben. Damit solche kleinen Axone bei sämtlichen Tieren nicht in die Auswertung einfließen und in „age-matched“ Kontrollen eine Myelinisierung von ca. 95 % erreicht wird, wurde ein Grenzwert für den Axondurchmesser festgelegt, der 300 nm betrug. Alle Axone mit einem Durchmesser, der über diesem Wert lag, gingen in die Auswertung ein. Unter Berücksichtigung der genannten Parameter ergab sich nach Auswertung aller Daten folgendes Bild (Abb. 50): Die 6-wöchige Behandlung mit Cuprizone führte zu einem Anstieg der nicht-myelinisierten Fraktion von ~5 % („age-matched“ Kontrollen) auf ~66 %. Tiere dieser Gruppe zeigten 3 Wochen nach Absetzen von Cuprizone nur noch ~34 % nicht-myelinisierte Axone. Im Gegensatz dazu war bei den Sst-behandelten Tieren eine deutliche Verzögerung der Remyelinisierung erkennbar. Unter beiden in die Auswertung eingehenden Sst-Konzentrationen (10 und 50 mg/kg b.wt.) blieben nach 3 Wochen ~48 % der Axone nicht-myelinisiert. Nach insgesamt 6 Wochen war der beschriebene Unterschied zur Kontrollgruppe noch größer. Die Kontrolltiere verbesserten sich weiter und zeigten mit einem Anteil von ~11 % nicht-myelinisierter Axone eine nahezu vollständige Remyelinisierung. Dagegen konnten sich Sst-behandelte Tiere mit einem Anteil nicht-myelinisierter Axone von 42 % (10 mg Sst/kg b.wt.) bzw. 44 % (50 mg Sst/kg b.wt.) im Vergleich zu den Werten nach 3 Wochen kaum verbessern.

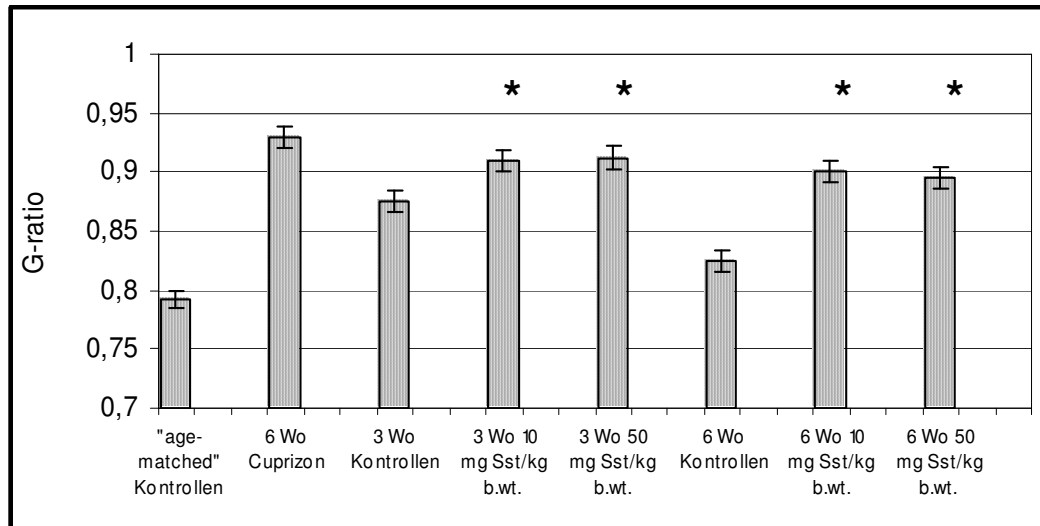


**Abb. 50: Bestimmung der Anteile nicht- und (re)myelinisierter Axone nach Absetzen von Cuprizon und Behandlung mit Sst.** „Age-matched“ Kontrollen wiesen eine Myelinisierung von ca. 95 % auf. Die Behandlung mit Cuprizon führte nach 6 Wochen zu einer Demyelinisierung, bei der nur noch ~34 % der Axone myelinisiert waren. Nach Absetzen der Diät remyelinisierten die Kontrollen und zeigten nach 3 Wochen wieder ~66 % myelinisierte Axone. Nach insgesamt 6 Wochen war die Remyelinisierung nahezu abgeschlossen, der Anteil myelinisierter Axone betrug ~89 %. Die Behandlung mit Sst führte, unabhängig von der applizierten Konzentration, zu einer deutlichen Verzögerung der Remyelinisierung. So betrug der Anteil der myelinisierten Fraktion 3 Wochen nach Absetzen von Cuprizon ~52 %. Gegenüber den Kontrolltieren, die in den folgenden 3 Wochen fast vollständig remyelinisierten (89 % myelinisierte Axone), zeigten die Sst-behandelten Tiere nach insgesamt 6 Wochen nur einen myelinisierten Anteil von 58 % (10 mg Sst/kg b.w.t.) bzw. 56 % (50 mg Sst/kg b.w.t.).

#### 10.4.2.1 Bestimmung der G-ratio

Die G-ratio beschreibt das Verhältnis von nacktem zu bemarktem Axon (MERKLER et al., 2005). Unter Kontrollbedingungen war davon auszugehen, dass die Dicke der Myelinschicht proportional zum Axondurchmesser ist. Da bei Bestimmung dieses Quotienten in Kontrollen und Sst-behandelten Tieren nur myelinisierte Axone eingingen, ließen sich im Zuge einer Erniedrigung dieses Wertes nach Absetzen von Cuprizon Aussagen über eine Remyelinisierung machen (Abb. 51). Für „age-matched“ Kontrollen wurde ein Wert von ~0,79 gemessen, der innerhalb der in der Literatur angegebenen Standardwerte lag (BLAKEMORE, 1974). Nach 6 Wochen Cuprizon stieg der Wert infolge einer Demyelinisierung auf ~0,93. Im Zuge der Remyelinisierung nach Absetzen von Cuprizon verringerte sich die G-ratio in Kontrollen nach 3 Wochen auf ~0,88 und lag nach 6 Wochen mit ~0,82 fast auf dem Ausgangswert von „age-matched“

Kontrollen. Sst-behandelte Tiere zeigten, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, nach 3 Wochen eine G-ratio von  $\sim 0,91$  und nach insgesamt 6-wöchiger Behandlung einen Wert von  $\sim 0,90$ . Axone von Tieren, die mit Sst behandelt wurden, wiesen somit gegenüber Kontrollen eine dünnere Myelinschicht auf.

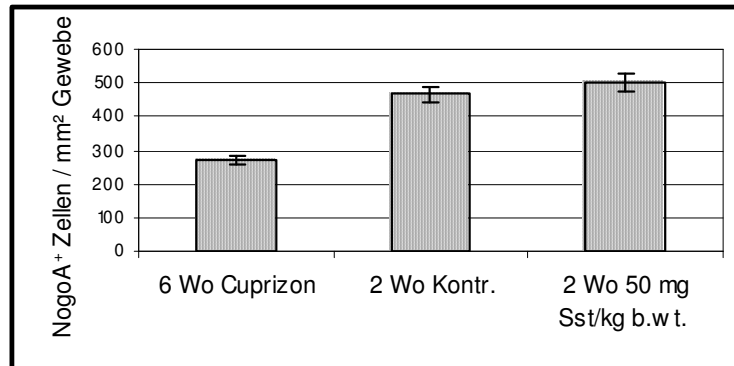


**Abb. 51: Bestimmung der G-ratio.** „Age-matched“ Kontrollen zeigten eine G-ratio von  $\sim 0,79$ , Cuprizon-behandelte Tiere einen Wert von  $\sim 0,93$ . Nach Absetzen von Cuprizon verringerte sich die G-ratio in Kontrollen nach 3 Wochen auf  $\sim 0,88$  und nach insgesamt 6 Wochen auf  $\sim 0,82$ . Sst-behandelte Tiere zeigten dagegen unabhängig von der applizierten Konzentration nach 3 Wochen eine G-ratio von  $0,91$ . Mit einem Wert von  $\sim 0,90$  nach insgesamt 6 Wochen Sst verringerte sich dieser Wert nur unwesentlich. Gegenüber den jeweiligen Kontrollen wich die kaum stattgehabte Verminderung der G-ratio Sst-behandelter Tiere signifikant ab ( $p < 0,001$ ).

### 10.5 Nogo-A-Färbung zur Auszählung von OL

Unter III.10.3 konnte gezeigt werden, dass Sst eine Remyelinisierung beeinträchtigt, was durch Blockierung der zur Remyelinisierung führenden Signalwege und/oder oligodendroglialen Zelltod zustande kommen könnte. Eine immunzytochemische Färbung mit NogoA diente zur Untersuchung, ob OL-Vorläuferzellen und reife OL betroffen sind (CHEN et al., 2000; HUBER et al., 2002). Nach Behandlung mit Cuprizon wurden  $\sim 270$  positive Zellen /  $\text{mm}^2$  Gewebe nachgewiesen. 2 Wochen nach Absetzen der Diät wurden  $\sim 470$  NogoA<sup>+</sup> Zellen /  $\text{mm}^2$  Gewebe gezählt. Mit einem Wert von  $\sim 500$  NogoA<sup>+</sup> Zellen /  $\text{mm}^2$  Gewebe bei den für 2 Wochen mit Sst behandelten Tieren (exemplarisch für 50 mg/kg b.wt. dargestellt) unterschied sich die OL-Zahl nur

unwesentlich von den Kontrollen. Sst führte damit während der Remyelinisierungsphase zu keiner Änderung der OL-Zahl (Abb. 52).

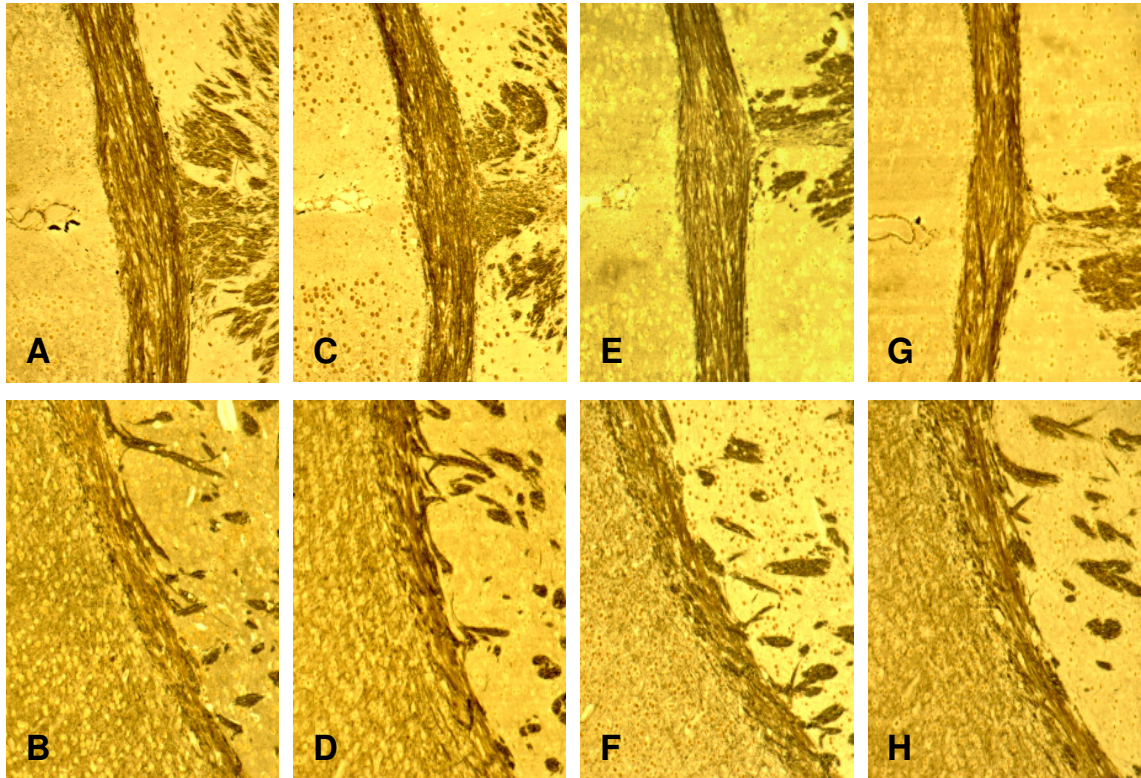


**Abb. 52: NogoA-Färbung zur Darstellung von OL.** Nach 6-wöchiger Cuprizon-Behandlung konnten ~270 NogoA<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe gezählt werden. 2 Wochen nach Absetzen von Cuprizon wurden ~470 NogoA<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe detektiert. Die Behandlung mit Sst für diesen Zeitraum führte mit einem Wert von ~500 NogoA<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe zu keiner signifikanten Änderung der OL-Zahl.

## 10.6 Einfluss von Cuprizon und Sst auf Axone

### 10.6.1 Darstellung von Axonen nach Bielschowsky

Zur Übersicht inwieweit Axone infolge der Behandlung mit Cuprizon bzw. Sst gegenüber „age-matched“ Kontrollen geschädigt worden waren, wurde eine Färbung nach Bielschowsky vorgenommen. Zwischen „age-matched“ Kontrollen (Abb. 53 A+B) und für 6 Wochen mit Cuprizon behandelten Tieren (Abb. 53 C+D) war kein Unterschied feststellbar. Die Behandlung mit Sst, exemplarisch dargestellt an 3 Wochen behandelten Tieren (10 mg Sst/kg b.wt. - Abb. 53 E+F sowie 50 mg Sst/kg b.wt. - Abb. 53 G+H), ergab ebenfalls im Vergleich zu Kontrollen keine sichere Abweichung. Soweit durch diese Färbung beurteilt werden konnte, führte weder Cuprizon noch Sst zu einer wesentlichen, über Bielschowsky erkennbaren, Schädigung von Axonen.



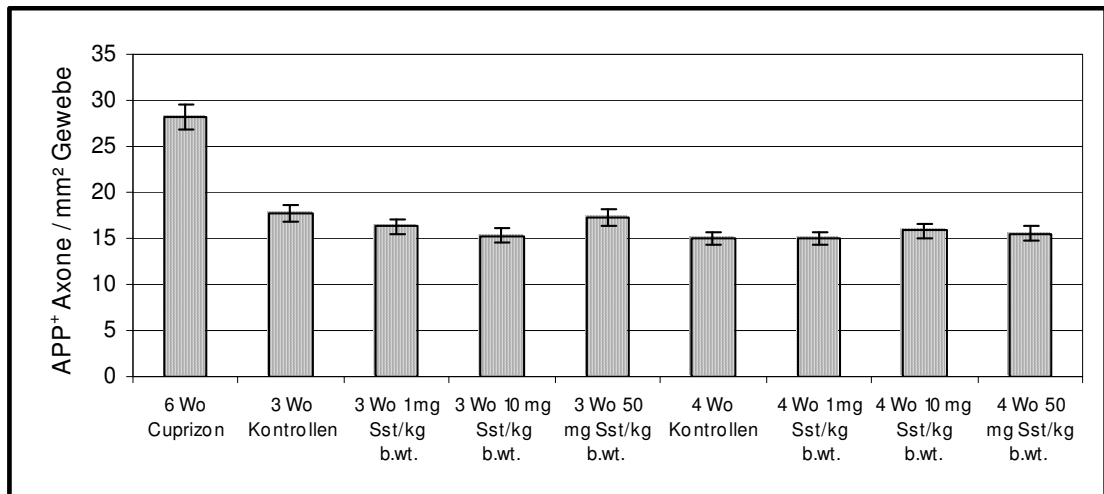
**Abb. 53: Bielschowsky Färbung zur Darstellung von Axonen im medialen (A, C, E, G) und lateralen (B, D, F, H) Bereich des corpus callosum in „age-matched“ Kontrollen, nach Absetzen von Cuprizon und in Sst-behandelten Tieren.** Gegenüber „age-matched“ Kontrollen (A+B) kam es infolge der Cuprizon-Diät (C+D) zu keiner sichtbaren Schädigung von Axonen. Auch unter 10 mg Sst/kg b.wt. (E+F) und 50 mg Sst/kg b.wt. (G+H) wurden nach 3 Wochen keine Unterschiede gegenüber „age-matched“ Kontrollen festgestellt. Lichtmikroskopische Abbildungen in 100facher Vergrößerung.

### 10.6.2 APP-Färbung zur Darstellung geschädigter Axone

Gegenüber der Bielschowsky-Übersichtsfärbung konnten über Markierung von APP („Amyloid precursor protein“) einzelne geschädigte Axone nachgewiesen werden. Ubiquitär vorhandenes APP wird durch axonalen Transport befördert und lässt sich unter Normalbedingungen immunzytochemisch nicht nachweisen. Erst wenn es infolge einer Schädigung des axonalen Transports zur Akkumulation von APP am Ort des Schadens kommt, gelingt eine immunzytochemische Markierung (FERGUSON et al., 1997).

Nach 6 Wochen Cuprizon konnte mit  $\sim 28$  APP<sup>+</sup> Axonen / mm<sup>2</sup> Gewebe nur eine geringe Zahl geschädigter Axone nachgewiesen werden (Abb. 54). 3 Wochen nach Absetzen der Diät wurden in den Kontrolltieren  $\sim 17$  APP<sup>+</sup> Axone / mm<sup>2</sup> Gewebe gezählt. Mit Werten zwischen  $\sim 15$ -17 APP<sup>+</sup> Axonen / mm<sup>2</sup> Gewebe in den für 3

Wochen mit verschiedenen Sst-Konzentrationen behandelten Tieren war kein signifikanter Unterschied zu Kontrollen sichtbar. 4 Wochen nach Absetzen von Cuprizon lag dieser Wert bei ~15, die Sst-behandelten Tiere zeigten zwischen ~15-16 APP<sup>+</sup> Axone / mm<sup>2</sup> Gewebe. Somit führte Sst weder zu einer Verschlechterung noch zu einer Verbesserung der axonalen Schädigung.



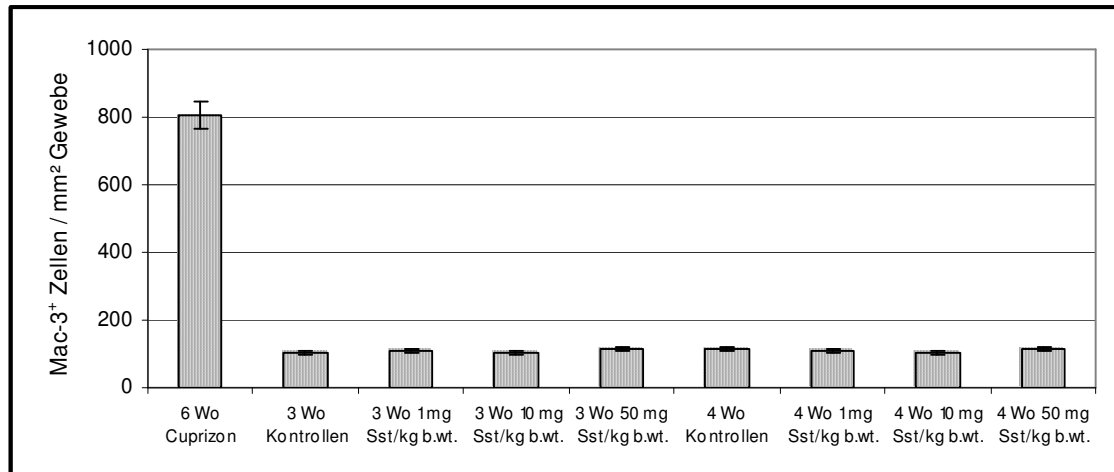
**Abb. 54: APP-Färbung zur Darstellung geschädigter Axone.** Nach 6-wöchiger Cuprizon-Behandlung wurden ~28 APP<sup>+</sup> Axone / mm<sup>2</sup> Gewebe gezählt. Infolge des Absetzens der Diät ging die Zahl wieder zurück. Gegenüber den Kontrollen nach Absetzen von Cuprizon hatte die Behandlung mit Sst zu den untersuchten Zeitpunkten keinen Einfluss auf die Anzahl detektierbarer geschädigter Axone.

### 10.7 Mac-3-Färbung zur Darstellung aktivierter Mikroglia

Infolge einer Demyelinisierung kommt es in den entstandenen Plaques zur Aktivierung von Mikrogliazellen. Das Ausmaß dieser durch Cuprizon ausgelösten Aktivierung sowie deren Verlauf nach Absetzen der Diät und unter Sst wurden durch Mac-3-Färbung untersucht (Abb. 55). Die Behandlung mit Cuprizon führte aufgrund der Demyelinisierung zu einer deutlichen Aktivierung von Mikroglia (~800 Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe) gegenüber „age-matched“ Kontrollen (~1,4 Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe, MERKLER et al., 2005). 3 Wochen nach Absetzen von Cuprizon sank der Wert auf ~105 Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe. Die Behandlung mit Sst für 3 Wochen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen gegenüber Kontrollen; für behandelte Tiere wurden Werte zwischen ~105-116 Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe gezählt. Auch eine Woche später konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen Sst-behandelten Tieren (~103-112 Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe)



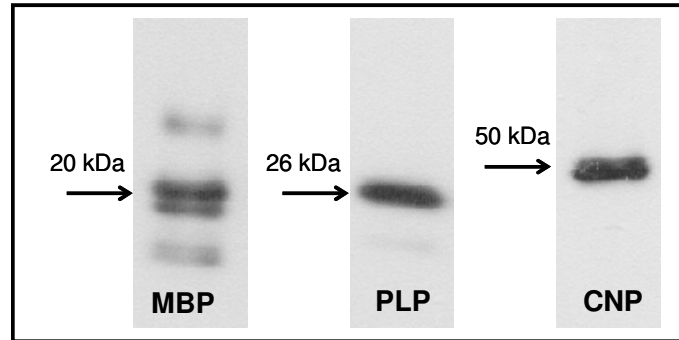
und Kontrolltieren ( $\sim 114$  Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe) festgestellt werden. Die Sst-Behandlung hatte folglich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Einfluss auf die Zahl aktivierter Mikrogliazellen.



**Abb. 55: Mac-3-Färbung zur Darstellung aktivierter Mikroglia.** Die Behandlung mit Cuprizon führte zu einem Anstieg aktivierter Mikroglia gegenüber „age-matched“ Kontrollen (1,4 Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe) auf  $\sim 800$  Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe. 3 Wochen nach Absetzen von Cuprizon ging dieser Wert auf  $\sim 105$  zurück; eine Woche später wurden in den Kontrolltieren  $\sim 114$  Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe gezählt. Sst hatte keinen Einfluss auf die Zahl aktivierter Mikrogliazellen. Zu beiden untersuchten Zeitpunkten (3 und 4 Wochen) unterschieden sich die Werte der Mac-3<sup>+</sup> Zellen / mm<sup>2</sup> Gewebe unwesentlich von denen der Kontrolltiere.

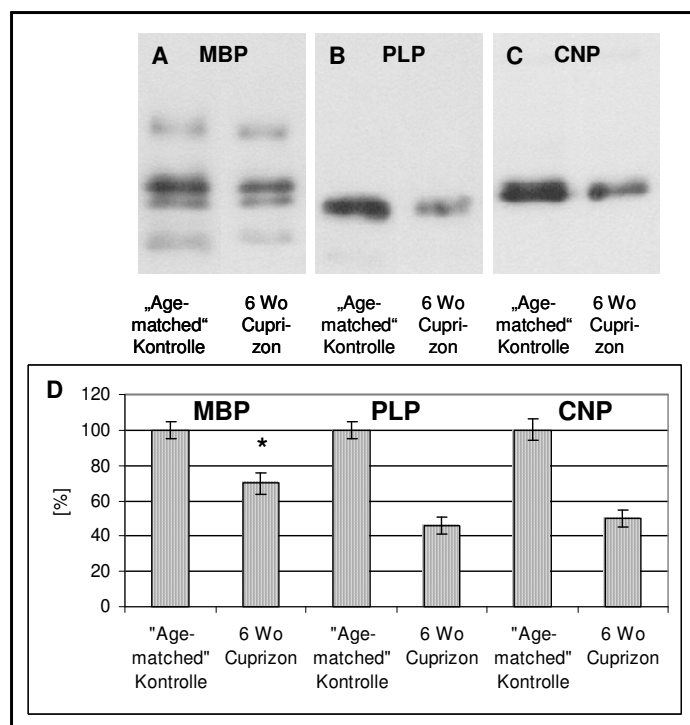
### 10.8 Einfluss von Sst auf die Synthese von Myelinproteinen in vivo

Unter III.8. konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Sst in vitro zu einer Hemmung der Synthese von Myelinproteinen führt. LFB-PAS-Färbung (s. III.10.3.1) sowie TEM (s. III.10.3.2) hatten erkennen lassen, dass die Remyelinisierung unter Sst in vivo innerhalb des untersuchten Zeitraums verlangsamt war. Ob damit auch eine reduzierte Synthese von Myelinproteinen einherging, wurde im Folgenden untersucht. Eine Darstellung von MBP, PLP und CNP erfolgte nach Auftrennung von Hirnlysat im SDS-Gel über Western Blot mit spezifischen Antikörpern (Abb. 56).



**Abb. 56: Darstellung der Myelinproteine MBP, PLP und CNP im Western Blot.** Für die Detektion von MBP wurde 1 µg Protein eines Hirnlysats von „age-matched“ Kontrollen im SDS-Gel aufgetrennt. Unter Verwendung eines spezifischen MBP-Antikörpers traten zwei Hauptbanden bei 18 und 20 kDa auf. Für die Detektion des ~30 kDa großen PLP, im SDS-Gel bei ~26 kDa laufend, wurden 5 µg Protein des Hirnlysats im SDS-Gel aufgetrennt. Für den Nachweis von CNP (Doppelbande bei ~50 kDa) betrug die optimale im SDS-Gel aufgetrennte Proteinmenge des Hirnlysats 20 µg.

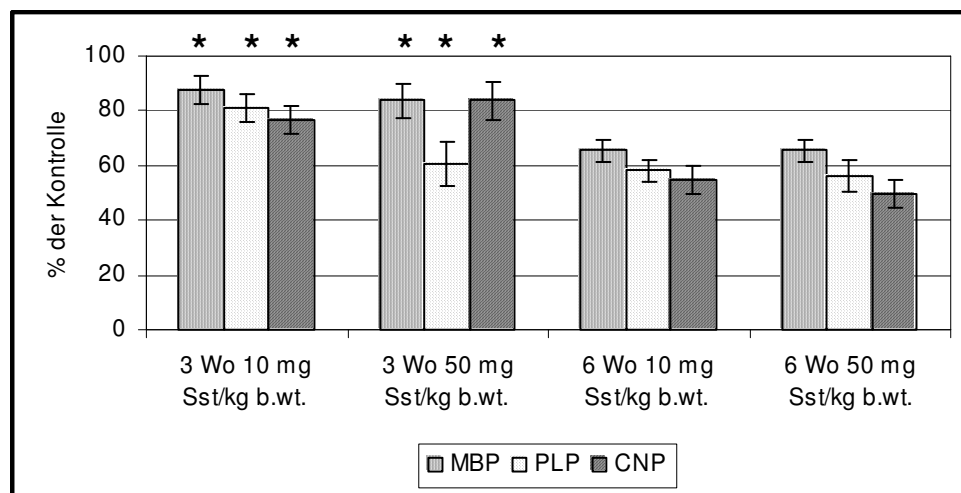
Nach Absetzen von Cuprizin war in den Hirnlysaten der Tiere infolge der Demyelinisierung der Anteil an Myelinproteinen deutlich vermindert. Für MBP war der Anteil um ~30 %, für PLP um ~54 % und für CNP um ~50 % im Vergleich zu „age-matched“ Kontrollen reduziert (Abb. 57 A-C).



**Abb. 57: Nachweis der Myelinproteine MBP, PLP und CNP nach Behandlung mit Cuprizin.** A: Die 6-wöchige Behandlung mit Cuprizin führte im Vergleich zu „age-matched“ Kontrollen zu einer

Verminderung der Myelinproteine MBP um ~30 % ( $p < 0,001$ ) (A), PLP um ~54 % (B) sowie CNP um ~50 % (C). Zur Detektion der Myelinproteine wurden folgende Proteinmengen des Hirnlysats eingesetzt: 1  $\mu\text{g}$  (MBP), 5  $\mu\text{g}$  (PLP) bzw. 20  $\mu\text{g}$  (CNP). D: Scion Image der quantifizierten Banden im Western Blot

Bei der Umstellung von Cuprizin auf normales Futter begann in Kontrolltieren nach 3 Wochen eine deutliche Remyelinisierung; nach insgesamt 6 Wochen waren wieder ~89 % der Axone remyelinisiert (s. III.10.3.2). Dass diese morphologischen Befunde biochemisch mit einer Neusynthese von Myelinproteinen einhergingen, konnte an diesen Tieren auch im Western Blot gezeigt werden. Bei den mit Sst behandelten Tieren war ebenfalls eine Neusynthese von Myelinproteinen nachweisbar, im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen war diese jedoch vermindert (Abb. 58). Nach insgesamt 6 Wochen Sst waren im Vergleich zu Kontrollen, denen kein Sst appliziert wurde, ~35 % weniger MBP, ~43 % weniger PLP sowie ~52 % weniger CNP nachweisbar. Zwischen den applizierten Sst-Konzentrationen von 10 und 50 mg/kg b.wt. bestanden dabei keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 58: Nachweis der Myelinproteine MBP, PLP und CNP nach Cuprizin und Sst.** Bei der nach Absetzen von Cuprizin einsetzenden Remyelinisierung kam es durch Behandlung mit Sst zu einer verminderten Neusynthese von Myelinproteinen; der Unterschied zu den unter normalem Futter remyelinisierenden Kontrollen war bereits nach 3 Wochen signifikant und betrug nach insgesamt 6 Wochen Sst, unabhängig von der Konzentration, für MBP ~35 %, für PLP ~43 % und für CNP ~52 %.

## IV Diskussion

Eine effiziente Behandlung von Autoimmunerkrankungen zählt in der Medizin zu den großen Herausforderungen. Zur Therapie einer MS haben sich Medikamente durchgesetzt, deren Wirkmechanismus den Entzündungsprozess im Hirn aufhalten soll. Mit den bisher eingeschlagenen Wegen werden aber allenfalls Teilerfolge erzielt. Daher besteht das Bestreben von Wissenschaftlern verschiedener Fachrichtungen zur Optimierung einer solchen Therapie beizutragen. In Überlegungen für die Entwicklung verbesserter Behandlungsstrategien wurden Statine einbezogen, die bisher therapeutisch zur Cholesterinsenkung bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt worden sind. Die sie zusätzlich auszeichnenden antiinflammatorisch / immunmodulatorischen Eigenschaften waren Grundlage für Experimente an EAE-Mäusen. Ergebnisse dieser Untersuchungen führten dazu, dass nach Durchführung von zwei klinischen Studien mit einer kleinen Patientenzahl von einem positiven Effekt von Statinen auf die Entwicklung neuer Läsionen berichtet wurde. Wenig beachtet blieb jedoch bisher der Aspekt einer Remyelinisierung, die neben der Behandlung einer Entzündungsreaktion einen wichtigen Teil der Therapie darstellen und nicht beeinträchtigt sein sollte. Ob Statine dieser Anforderung gerecht werden, d.h. zumindest nicht einer Remyelinisierung entgegenzustehen, wurde bisher nur ungenügend belegt.

### 1. Konversion von Simvastatin-Lacton zur Hydroxyform

Sst entfaltet seine Wirksamkeit als kompetitiver Hemmer der HMG-CoA-Reduktase nur in der aktiven Hydroxyform (CARLUCCI et al., 1992, ZHAO et al., 2000). Für diverse Versuche stand Sst sowohl in der aktiven Hydroxyform als auch in der inaktiven Lactonform zur Verfügung. Dass beide Formen bei primär kultivierten Schweine-OL zu gleichen morphologischen Effekten führten, die auch hinsichtlich des zeitlichen Auftretens nahezu identisch waren, konnte als Indiz für eine rasche Umwandlung in die Hydroxyform gelten. An Neuroblastomzellen hat man zeigen können, dass diese Konversion bereits durch nichtenzymatische Hydrolyse ablaufen kann; die geschlossene Ringstruktur von Mevastatin wurde dabei in vitro rasch in die aktive offene Ringstruktur umgewandelt (KUMAR et al., 2002). Über HPLC konnte eine Konversion von Sst-Lacton in die aktive Hydroxy-Form dargestellt werden. So standen bereits nach 2 h ~5 % der zugegebenen Menge als aktive Hydroxyform zur Verfügung, nach

insgesamt 15 h Inkubation war rund die Hälfte der Lactonform umgewandelt. Folglich konnten beide Formen für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Einzig bei der Bestimmung toxischer Konzentrationen ergab sich ein Unterschied. Während dieser Wert unter Hydroxy-Sst bei 150  $\mu\text{M}$  lag, führte unter Sst-Lacton bereits eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  zur Lyse der Zellen. Dieser im Verhältnis zur Hydroxyform deutlich niedrigere Schwellenwert liegt möglicherweise darin begründet, dass die Lactonform eher zu einer Destabilisierung der Zellmembran führt, woraus eine gesteigerte Zytotoxizität resultieren könnte (EVANS und REES, 2002).

## **2. Morphologische Auswirkungen von Simvastatin auf Schweine-Oligodendrozyten**

Die Applikation von Sst führte bei primär kultivierten Schweine-OL zu morphologischen Veränderungen, deren Beginn nach 24 h elektronenmikroskopisch und nach 48 h lichtmikroskopisch sichtbar war. Von OL ausgebildete flächige Membranen, die nur elektronenmikroskopisch dargestellt werden konnten, waren bereits nach 24 h komplett verschwunden. Eine zu diesem Zeitpunkt einsetzende Fortsatzretraktion dauerte weitere 48 h an, wobei sich OL dabei abrundeten und von der Kulturschale ablösten. Solche Effekte konnten vor kurzem bei OL-Vorläuferzellen von Mensch und Ratte sowie reifen humanen OL (MIRON et al., 2007) gezeigt werden. Unter Verwendung vergleichbarer Sst-Konzentrationen (1-10  $\mu\text{M}$ ) war bei OL-Vorläuferzellen nach einem Behandlungszeitraum von 48 h eine Fortsatzretraktion erkennbar, die weitere 48 h später mit einem Anstieg der Zelltodrate einherging; bei humanen OL-Vorläuferzellen waren diese Effekte bereits ab 100 nM Sst zu sehen. Reife humane OL zeigten gleiche Auswirkungen ab einer Sst-Konzentration von 100 nM nach 8 Tagen. Es kam bei den von MIRON et al. (2007) verwendeten Zellen anfänglich (nach 24 h Sst) zu einem verstärkten Fortsatzwachstum. Auch SATO-SUZUKI und MUROTA (1996) beobachteten bei PC12 Zellen, die mit 1  $\mu\text{M}$  Sst behandelt wurden, zunächst ein Auswachsen der Fortsätze. Ebenso führten 100  $\mu\text{M}$  des hydrophilen Pravastatins bei Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte bereits nach 4 h zu einem verstärkten Fortsatzwachstum, das insgesamt 48 h nach Zugabe von Pravastatin anhielt (POOLER et al., 2006). Warum es anfänglich zu einem stimulierten Fortsatzwachstum kam, wurde nicht erwähnt. Angedacht wurde, dass Statine bei Durchdringen der Membran die Fluidität dieser ändern, was eine kurzfristige Dimerisierung von

Rezeptoren wie TrkA zur Folge haben und mit der Initiation von Signalkaskaden einhergehen könnte. Ob eine weiterführende Inkubation unter Pravastatin mit Fortsatzretraktion und einsetzendem Zelltod einhergegangen wäre, wurde dabei nicht untersucht. Bei den Untersuchungen von MIRON et al. (2007) war allerdings ein Auswachsen von OL-Fortsätzen unter Sst vom Zelltod gefolgt (MIRON et al., 2007); auch PC12-Zellen starben bei Zugabe von Sst nach 36 h (KUMANO et al., 2000).

Ein durch Sst ausgelöstes stimuliertes Fortsatzwachstum war bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Schweine-OL zu keinem Zeitpunkt sichtbar. Konzentrationen ab 1  $\mu$ M Sst riefen eine Fortsatzretraktion hervor, darunter liegende Konzentrationen waren nicht mit einer positiven Beeinflussung des Fortsatzwachstums verbunden.

Der  $K_i$ -Wert für den Statin-Enzym-Komplex liegt zwischen 0,1-2,3 nM (ISTVAN und DEISENHOFER, 2001); eine Hemmung der HMG-CoA Reduktase sollte unter allen eingesetzten Sst-Konzentrationen stattfinden. Dass bei 1  $\mu$ M nur dann eine Fortsatzretraktion sichtbar war, wenn Sst nach 24 h erneut zugegeben wurde, deutet auf einen Schwellenwert hin, bei dem die einsetzende Sst-Metabolisierung mit der Konzentration der aktiven Sst-Hydroxyform konkurriert. Unter allen darüber liegenden Konzentrationen war die trotz Metabolisierung vorliegende Menge des aktiven Statins zu allen untersuchten Zeitpunkten ausreichend, um die HMG-CoA Reduktase zu hemmen.

### **3. Cholesterin und Intermediate der Cholesterinbiosynthese unter Simvastatin**

Der Cholesterinspiegel bei Schweine-OL konnte nach 4-tägiger Sst-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle um ca. 15 % gesenkt werden. Diese Reduktion war jedoch nur unter Verwendung eines speziellen Serums (FCS-GOLD) mit einem geringen Cholesteringehalt messbar, „herkömmliches“ FCS enthielt je nach Charge das 10- bis 40-fache an Cholesterin. OL zeichnen sich durch eine hohe Eigenproduktion von Cholesterin aus, daneben besitzen sie aber auch membranständige Cholesterintransporter (DIETSCHY und TURLEY, 2004). Unter „herkömmlichem“ FCS konnte Cholesterin aus dem Medium aufgenommen und der durch Sst abgesenkte Cholesterinwert ausgeglichen werden.

Bemerkenswert war jedoch die nur unwesentliche Reduktion des oligodendroglialen Cholesterins zum Zeitpunkt des Auftretens morphologischer Veränderungen. Nach insgesamt 72 h Sst, als die Fortsätze der OL schon komplett retrahiert waren und die Zellen begannen, sich vom Boden der Kulturschale abzulösen, war der oligodendrogliale Cholesteringehalt nur um ca. 8 % reduziert. Dass zu diesem Zeitpunkt noch genügend Cholesterin zur Verfügung stand, war ein Indiz dafür, dass Cholesterin per se für die Sst-Effekte nicht verantwortlich sein konnte. Unterstützt wurde diese Vermutung durch den Befund, dass eine Verwendung von herkömmlichem Serum, mit dem es zu keiner messbaren Reduktion des Cholesteringehaltes kam, bei Applikation von Sst ebenfalls zur Fortsatzretraktion führte. Eine gleichzeitige Zugabe von Cholesterin und Sst konnte den morphologischen Veränderungen nicht entgegenwirken, was mit Untersuchungen an PC12 Zellen einhergeht, bei denen ein durch Atorvastatin hervorgerufener Fortsatzverlust durch Zugabe von Cholesterin nicht kompensiert werden konnte (SCHULZ et al., 2004). Da Statine die Cholesterinbiosynthese bereits auf der Ebene von Mevalonat hemmen, scheinen vielmehr Intermediate des Syntheseweges für die durch Statine ausgelösten Effekte verantwortlich zu sein. Auf eine verminderte Synthese von GGPP und FPP sind eine Reihe pleiotroper Statineffekte zurückzuführen, die durch Beeinflussung der Funktion kleiner G-Proteine zustande kommen (HAUSDING et al., 2000; LIAO 2002; CORDLE et al., 2005; LIAO und LAUFS, 2005; GHITTONI et al., 2006). Eine Relevanz der Intermediate für den Prozess der Fortsatzbildung in Schweine-OL konnte durch Zugabe von Mevalonat und GGPP gezeigt werden. Sie waren in der Lage, die durch Sst hervorgerufenen morphologischen Veränderungen vollständig zu kompensieren. Einzig FPP konnte zunächst den Sst-Effekt nicht aufheben. Ebenso wie in Schweine-OL war auch bei glatten Muskelzellen beobachtet worden, dass Sst-Effekte durch Zugabe von FPP nicht kompensiert wurden (NÈGRE-AMINO et al., 2001). Ein apoptotischer Effekt von Sst auf glatte Gefäßmuskelzellen konnte hingegen durch Zugabe von FPP verhindert werden (BLANCO-COLIO et al., 2002). Ob exogenes FPP eine Wirkung entfalten kann, ist wahrscheinlich vom Zellsystem abhängig und dürfte in der Eigenschaft dieses Intermediates begründet liegen: Im Gegensatz zu GGPP ist FPP weniger hydrophob, woraus eine schlechtere Zellgängigkeit resultiert (NÈGRE-AMINO et al., 2001). Um FPP in OL einzubringen, wurde es mittels eines Transfektionsagens in positiv geladene Partikel gepackt, die mit anionischen Glykanen der Zelloberfläche interagieren und über Endozytose FPP in Schweine-OL einschleusen. Eine anschließende Zugabe von Sst

führte gegenüber der Kontrolle zu keinerlei morphologischen Veränderungen bei Schweine-OL, die Statineffekte konnten in der Tat auch durch FPP kompensiert werden.

#### **4. Simvastatin und kleine G-Proteine**

Innerhalb der Cholesterinbiosynthese werden aus Mevalonat die Zwischenprodukte FPP und GGPP gebildet. Durch Zugabe dieser Intermediate konnte gezeigt werden, dass eine Prenylierung kleiner G-Proteine für die Fortsatzbildung von Bedeutung ist. Interessanterweise trugen offensichtlich sowohl farnesylierte als auch geranylgeranylierte G-Proteine dazu bei.

##### **4.1 p21Ras – Membranassoziation und Aktivierung, MAPK-Aktivität**

Eine posttranslationale Modifizierung von p21Ras erfolgt am Carboxyterminus des Proteins und ist für die Funktion essentiell. Die dabei stattfindenden Schritte sind: Prenylierung des Cysteins am CAAX-Motiv (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = carboxyterminale Aminosäure), proteolytische Spaltung der drei carboxyterminalen Aminosäuren und Carboxyl-Methylierung des jetzt C-terminal prenylierten Cysteins (MENDOLA und BACKER, 1990; BREDEL und POLLACK, 1999). An NIH 3T3 Zellen hat man gezeigt, dass es sich bei dem Isoprenoid für p21Ras um FPP handelt (CASEY et al., 1989). Die Verknüpfung mit p21Ras als Voraussetzung für die Membranverankerung erfolgt über eine Thioetherbindung und wird von der Farnesyltransferase (FTase) katalysiert (WILLUMSEN et al., 1984; MANNE et al., 1990). Ras-Proteine werden ausschließlich farnesyliert, nur infolge einer Hemmung der FTase können K-Ras und N-Ras von einer Geranylgeranyltransferase prenyliert werden (LOBELL et al., 2001; SEBTI und DER, 2003).

Eine gezielte Hemmung der Aktivierung von p21Ras erscheint in einigen Fällen sinnvoll, gleichzeitig muss jedoch auch die Gesamtheit der auslösbaren Signalkaskaden kritisch betrachtet werden, wodurch sich ein mehr oder weniger sinnvoller Einsatz bei verschiedenen Krankheiten ergibt. Bei der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen hat sich der Einsatz von Statinen bewährt; positive Effekte werden dabei u.a. einer Hemmung der Funktion von p21Ras zugeschrieben (THIERY und BRÜGEL, 2003; LIAO und LAUFS, 2005). Sich abzeichnende antiinflammatorisch / immu-



modulatorische Wirkungen haben Statine auch für die Behandlung von MS interessant gemacht (WEKERLE, 2002; GREENWOOD et al., 2006). Bei der MS-Therapie gilt es aber nicht nur antiinflammatorisch / immunmodulatorisch zu wirken, sondern auch eine Remyelinisierung, die durch überlebende reife OL oder einwandernde Vorläuferzellen stattfindet, voranzutreiben. Dabei sollen OL Fortsätze bilden und nackte Axone bemerken. Eine Hemmung der Funktion von p21Ras in dieser Phase via Statine könnte negative Auswirkungen auf den Prozess haben, da die über p21Ras aktivierten MAPK ERK1/2 für das Fortsatzwachstum in OL von Bedeutung sind (ALTHAUS et al., 1997; ALTHAUS, 2004).

In Schweine-OL führte eine Inhibition der Synthese von FPP unter Sst zu einer verringerten Prenylierung von p21Ras, was in einer verminderten nachweisbaren Membranassoziation resultierte. Damit einher ging ein Anstieg von zytosolisch lokalisiertem p21Ras. Dass Statine die Prenylierung von p21Ras blockieren, hatte bereits die Behandlung von NIH 3T3 Zellen mit Mevastatin gezeigt (JACKSON et al., 1990).

Die Bedeutung von p21Ras für die Initiation einer Signalkaskade in Schweine-OL und eine damit einhergehende Fortsatzbildung wurde über Transfektion mit FPP aufgezeigt. Bei simultaner Zugabe von Sst kam es dabei zu keiner Verschiebung von membrangebundenem p21Ras ins Zytosol, morphologisch waren die Zellen nicht von Kontroll-OL unterscheidbar. Auch Mevalonat, aus dem FPP synthetisiert werden kann, konnte eine durch Sst hervorgerufene Verringerung von membrangebundenem p21Ras rückgängig machen.

Obwohl nach 72 h Sst noch ~60 % membranassoziiertes p21Ras gefunden wurde, schien der Einfluss auf die Aktivierung der Signalkaskade gravierend zu sein. Für die Analyse dieser Fragestellung wurde ein Aktivitätsassay durchgeführt, bei dem der Anteil an GTP-gebundenem Ras bestimmt wurde. Der nach Behandlung mit Sst verbleibende Membrananteil an p21Ras war nicht ausreichend, um dessen Aktivierung in dem Maß wie unter Kontrollbedingungen herbeizuführen. Stattdessen war der Anteil der GTP-gebundenen Form von p21Ras um ~60 % verringert. Auch in vivo konnte von der Arbeitsgruppe um LI (2005) ein vergleichbarer Effekt gezeigt werden. Dabei war Lovastatin in der Lage, eine durch Mutation eines GAPs hervorgerufene permanente Aktivierung von p21Ras im Gehirn von Mäusen auf das Niveau des Wildtyps herunterzuregulieren. Weiterhin führte dies zu einer Reduktion der in der Mutante

erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2, welche im Zuge der über p21Ras laufenden Signalkaskade aktiviert wurden.

Da der Anteil an GTP-gebundenem p21Ras in Schweine-OL durch Behandlung mit Sst deutlich verringert wurde, stellte sich die Frage, ob auch die Aktivität von ERK1/2 reduziert war. Die über ein In-Gel-Kinase-Assay bestimmte Aktivität von ERK1/2 war infolge der Applikation von Sst schon nach 48 h deutlich verringert und betrug nach insgesamt 72 h im Vergleich zur Kontrolle nur noch ~60 %. Vergleichbare Untersuchungen des Einflusses von Statinen auf die Aktivität von ERK1/2 in OL gibt es nicht, alle bisher veröffentlichten Resultate beziehen sich auf andere Zellsysteme. So wurden vergleichbare Effekte an thekalen Interstitialzellen aus dem Ovar der Ratte beobachtet, bei denen die Behandlung mit Mevastatin für 48 h mit einer verringerten Phosphorylierung von ERK1/2 einherging (KWINTKIEWICZ et al., 2006).

Bei Schweine-OL wurde bereits früher gezeigt, dass NGF das Fortsatzwachstum positiv beeinflusst und mit einer gesteigerten Aktivität von ERK1/2 einhergeht (ALTHAUS et al., 1992; ALTHAUS et al., 1997). NGF bindet an TrkA und bewirkt letztendlich die Aktivierung von p21Ras. Dass NGF die durch Sst hervorgerufene Verringerung der MAPK-Aktivität kompensieren kann, wurde nicht erwartet, da die NGF- Signalkaskade p21Ras als molekularen Schalter benötigt. In der Tat war weder morphologisch durch den Zusatz von NGF eine Verbesserung des Sst-Effektes erkennbar, noch eine Verbesserung der ERK1/2 Aktivität unter Sst. Dies ist insofern interessant, weil in OL über einen Signalweg von NGF diskutiert wird, der unabhängig von p21Ras Phospholipase- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) und Proteinkinase C (PKC) aktiviert, wobei letztere in der Lage ist, ERKs in OL zu aktivieren (ALTHAUS und RICHTERLANDSBERG, 2000; STARIHA und KIM, 2001). Nach Aktivierung von TrkA über NGF konnte eine Phosphorylierung von PLC- $\gamma$ 1 gezeigt werden (ALTHAUS et al., 1997). Eine damit einhergehende Aktivierung bewirkt die Hydrolyse von PI<sub>3,4</sub>P zu PI<sub>3,4,5</sub>P und Diacylglycerol (DAG). (BERRIDGE, 1987). Während PI<sub>3,4,5</sub>P Calcium aus internen Lagern mobilisiert, aktiviert DAG die PKC (NISHIZUKA, 1986; BERRIDGE, 1993). Da es unter NGF zu einer PLC- $\gamma$ 1 abhängigen Freisetzung von Calcium kam, war auch eine Aktivierung von PKC denkbar; eine signifikante Translokation oder Herabregulierung der PKC in OL infolge einer NGF-Behandlung war jedoch nicht nachweisbar (HEMPEL, 1998).

NGF konnte eine über Sst hervorgerufene Absenkung der Aktivitäten von ERK1/2 in OL nicht kompensieren; dies spricht auch hier dagegen, dass durch NGF über einen p21Ras unabhängigen Seitenweg PKC und anschließend ERK1/2 aktiviert werden.

## 4.2 Rho-Proteine – Membranassoziation und Aktivierung

Da durch einen Geranylgeranyltransferaseinhibitor Sst-ähnliche Effekte ausgelöst werden konnten, und GGPP die durch Sst ausgelösten morphologischen Veränderungen kompensierte, sind die unter Sst beobachteten Effekte nicht allein durch eine verminderte Funktion von p21Ras und der darüber vermittelten Signalkaskade zur Aktivierung der MAPK erklärbar. Vielmehr impliziert dies eine Beteiligung von Rho-Proteinen, da Ras ausschließlich über FPP prenyliert wird (BAR-SAGI, 2001).

Rho-Proteine sind an der Organisation sowie dem Umbau des Zytoskeletts beteiligt (MACKAY und HALL, 1998; TAKAI et al., 2001). So führt die Aktivierung von Rho-Proteinen zur Bildung von Stressfasern (RhoA), Lamellipodien (Rac) und Filopodien oder „Mikrospikes“ (Cdc42) (OLOFSSON, 1999). Das Zytoskelett von OL ist reich an Mikrotubuli und Mikrofilamenten (WILSON and BROPHY, 1989; BARRY et al., 1996). Mikrotubuli findet man im Zellkörper aber auch in Fortsätzen von OL, und Mikrofilamente, die sich aus zwei polymerisierten Strängen globulären Aktins zusammensetzen und auch als F-Aktin bezeichnet werden, sind zusätzlich am Ende der Fortsätze lokalisiert, wo sie an deren Verzweigung sowie der Bildung von „Mikrospikes“ beteiligt sind (SONG et al., 2001; RUMSBY et al., 2003). Durch einen Rhodamin-gekoppelten Phalloidin Antikörper ließen sich Mikrofilamente in Schweine-OL nachweisen. Sst-behandelte OL waren durch eine verminderte Anzahl detektierbarer Fortsätze und das Fehlen jeglicher Verzweigungen und „Mikrospikes“ gekennzeichnet. Eine Störung des Aktin-Zytoskeletts durch Behandlung mit Sst war bereits an Mikrogliazellen von Maus und Mensch aufgefallen (KUIPERS et al., 2006). Dabei waren eine Abnahme der Dichte von Aktinfasern sowie das Abrunden der Zellen Folgen der Statin-Behandlung.

In der Literatur gibt es Daten, die belegen, dass durch Statine hervorgerufene Effekte auf eine Störung der Funktion von Rho-Proteinen zurückzuführen sind. In Neurenkulturen aus dem Hippocampus der Ratte führten sowohl Lovastatin als auch ein Inhibitor der Geranylgeranyltransferase zur Zerstörung des Neuriten-Netzwerks

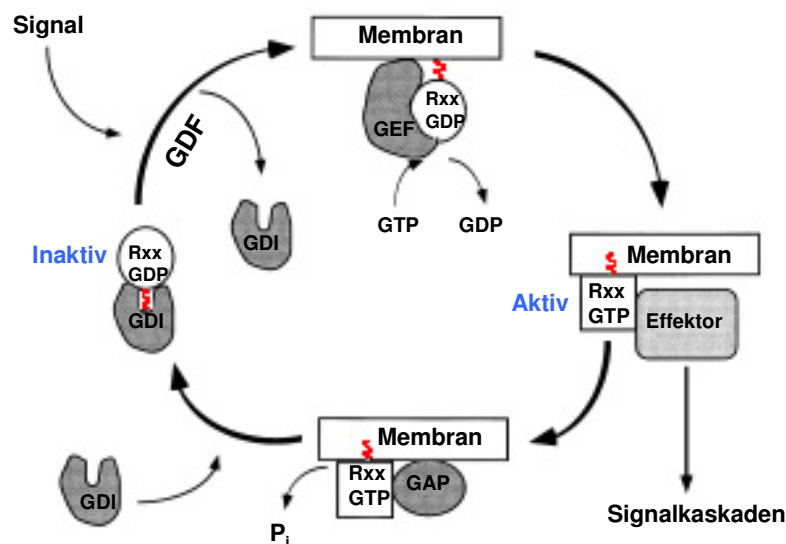
(MESKE et al., 2003). Als Ursache wurde eine verringerte Membranassoziation und damit einhergehende Funktionsstörung von RhoA angenommen.

Mit einem monoklonalen Antikörper konnte RhoA in Schweine-OL über Western Blot nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit Sst kam es wie bei p21Ras zu einer verminderten Membranassoziation von RhoA, während zytosolisches RhoA auf mehr als das Doppelte anstieg. Eine Verlagerung ins Zytosol war bereits 12 h nach Zugabe von Sst detektierbar. Gleichzeitig stieg die Gesamtexpression von RhoA auf mehr als das Doppelte. Aufgrund der im Vergleich zu Kontroll-OL reduzierten Membranständigkeit wurde analog zu p21Ras auch eine Verringerung der Aktivität von RhoA erwartet. Erstaunlicherweise ging die Sst-Behandlung aber bereits nach 24 h mit einem Anstieg an GTP-gebundenem RhoA einher, der sich bis 72 h nach Zugabe von Sst fortsetzte. Auch für Rac1 und Cdc42, die bei Schweine-OL mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden konnten, ergaben sich ähnliche Verhältnisse; unter Sst war nach 72 h ein Anstieg der GTP-gebundenen Form dieser Proteine zu erkennen. Ob die Sst-Behandlung auch bei Rac1 und Cdc42 mit einer Reduktion der Membranassoziation sowie einer Erhöhung des zytosolischen Anteils einhergegangen wäre, wurde nicht untersucht. Ein Grund dafür lag in der Schwierigkeit des Nachweises von Rac1 und Cdc42 begründet, der nur unter Einsatz enorm hoher Proteinmengen gelang. Da Rac1 und Cdc42 über GGPP prenyliert werden, sind vergleichbare Verhältnisse zu der an RhoA nachgewiesenen verminderten Membranverankerung denkbar.

Eine Reihe pleiotroper Effekte wird auf eine Störung der Funktion von Rho-Proteinen zurückgeführt. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die fehlende Prenylierung über verminderte Membranassoziation und fehlenden Austausch von GDP zu GTP mit einer reduzierten Aktivität von Rho-Proteinen einhergeht (LIAO und LAUFS, 2005). In der Literatur lassen sich dazu vergleichbare, aber auch gegensätzliche Ergebnisse finden. Zur Störung des Zytoskeletts und einer damit verbundenen Verringerung des im Pull-Down Assay gemessenen Anteils der GTP-gebundenen Form von RhoA kam es unter Fluvastatin bei glatten Gefäßmuskelzellen der Maus (KATO et al., 2004). Dagegen führte die Behandlung mit 1-20  $\mu$ M Sst und Lovastatin nach 18 h bei THP-1 Monozyten zu einer Erhöhung der GTP-gebundenen Formen von RhoA und Rac1, ein Anstieg von Rac-GTP unter diesen Statinen war ebenfalls bei BV-2-Mikrogliazellen (bei gleichzeitigem Fortsatzverlust und Abrunden der Zellen) und N2a-Neuroblastomzellen

der Maus sowie PC12 Zellen der Ratte zu verzeichnen (CORDLE et al., 2005). Eine Erhöhung der GTP-gebundenen Formen der aufgeführten GTPasen wurde auf die durch Statine verhinderte Interaktion mit RhoGDIs zurückgeführt.

GDI's hemmen eine Aktivierung von Rho- und Rac-Proteinen über mehrere Mechanismen: Unter Normalbedingungen sind die prenylierten Proteine im Zytoplasma mit GDI's komplexiert. Durch Insertion der Isoprenylgruppe der GTPase in eine hydrophobe Tasche der GDI's wird der Isoprenylrest abgeschirmt und eine Interaktion mit der Membran verhindert (Abb. 59). Folglich wird durch Hemmung der Dissoziation von GDP die Interaktion des kleinen G-Proteins mit GEF's und somit der Austausch von GDP gegen GTP verhindert. Ein weiterer Regulationsmechanismus ergibt sich aus einer möglichen Interaktion von GDI's mit der GTP-gebundenen Form der GTPase, was eine Bindung an Effektoren verhindert (OLOFSSON, 1999; ZALCMAN et al., 1999; McTAGGART, 2006). Im Vergleich zur GTP-gebundenen Form ist die Affinität von GDI's zur GDP-gebundenen Form von Rho-Proteinen deutlich höher (SASAKI et al., 1993). Der zentrale Auslöser einer durch Statinbehandlung beobachteten Hemmung der Interaktion mit GDI's ist vermutlich eine fehlende Prenylierung von Rho- und Rac-Proteinen.



**Abb. 59: Regulation von Rho- und Rac-Proteinen (Rxx).** Im inaktiven Zustand sind Rho- und Rac-Proteine über ihre Prenylgruppe (rot) mit GDI's im Zytoplasma komplexiert. Infolge einer Stimulation und unter der Wirkung von GDF („GDI-Displacement-Factor“) dissoziiert GDI und Rxx kann mit der freigelegten Prenylgruppe an der Membran binden, wo über Interaktion mit GEF eine Aktivierung erfolgt. Im aktivierten, GTP-gebundenen Zustand können die membranassoziierten GTPasen mit Effektoren

interagieren und Signalkaskaden auslösen. Nach der Signalübertragung erfolgt mit Hilfe von GAP die Inaktivierung von Rxx durch Hydrolyse von GTP (OLOFSSON, 1999, mod.)

Für eine Erhöhung von RhoA-GTP, Rac1-GTP sowie Cdc42-GTP sind zur Erklärung GDIs, GEFs und wahrscheinlich auch GAPs heranzuziehen. Aufgrund der fehlenden Prenylierung kommt es zu keiner Interaktion mit GDIs, d.h. ein Hemmmechanismus entfällt, was für RhoA gezeigt werden konnte: Zunächst wurden ProteinA-Sepharose-Beads mit Zelllysat und Anti-RhoGDI inkubiert und im Anschluss gebundene Proteine über Western Blot nach RhoA untersucht, was den Nachweis von komplexiertem RhoGDI-RhoA ermöglichte. Neben einer Hemmung der Interaktion von RhoGDI mit RhoA unter Sst war dabei auffällig, dass die im Western Blot dargestellte Bande des mit RhoGDI komplexierten RhoA trotz einer hohen Proteinmenge im Zelllysate (ca. 500 µg) sehr schwach war. Im Vergleich dazu ließen sich RhoGDI und RhoA allein (50 µg bzw. 30 µg Zelllysate-Protein von Kontroll-OL) im Western Blot sehr gut nachweisen. Da unter Kontrollbedingungen das Verhältnis von membrangebundenem zu zytosolischem RhoA ca. 1:2 betrug und zytosolisches RhoA mit RhoGDI komplexiert ist, wurde für diese Probe eine stärkere Bande erwartet. Ob Anti-RhoGDI die RhoA-Antikörpererkenntnisstelle maskiert und deshalb für den begrenzten Nachweis von RhoA ursächlich ist, bleibt offen.

Aufgrund einer fehlenden Geranylgeranylierung werden Membranassoziation und Interaktion mit RhoGDIs verhindert, worauf Rho-Proteine im GDP-gebundenen Zustand zytosolisch akkumulieren. Bei GTP-Überschuss im Zytosol könnten sie so offen für GEFs sein; der Aktivierungsmechanismus bleibt jedoch unklar, zumal bisher davon ausgegangen wurde, dass für einen Austausch zu GTP eine Membranassoziation von Rho-Proteinen unabdingbar sei. Denkbar wäre eine Interaktion mit zytosolischen GEFs oder ein spontaner Austausch von GDP gegen GTP. Im Fall von RhoA wurde in der Tat berichtet, dass „Syx“, ein GEF für RhoA, in zwei Spleißvarianten vorkommt, und zwar eine membrangebundene (Syx1) und eine zytosolisch lokalisierte (Syx2). In einer Hirntumorzelllinie ging ein signifikanter Level an exprimiertem Syx2 mit einer hohen Aktivität von RhoA einher (LIU und HOROWITZ, 2006). Es gäbe damit eine Möglichkeit, nicht membrangebundenes RhoA zu aktivieren; über eine Expression eines zytosolischen GEFs in OL ist jedoch bisher nichts bekannt. Neben GEFs bleibt zudem ungewiss, inwieweit die Funktion membrangebundener GAPs zum Tragen kommt. Da nur die prenylierten Formen von RhoA und Rac1 in der Lage sind, GAPs

zu binden (MOLNAR et al., 2001), könnte eine inhibierte Deaktivierung ebenfalls zu vermehrtem RhoA-GTP und Rac1-GTP beitragen. Für Cdc42 würde dies entfallen, da auch die nicht-prenylierte Form mit GAPs interagieren kann (MOLNAR et al., 2001).

Von einer Erhöhung an Rac-GTP infolge einer 24-stündigen Behandlung mit Atorvastatin wurde auch in humanen Endothelzellen der Umbilikalvene berichtet. Als Ursache wurde dabei über eine verminderte Interaktion mit GDIs oder eine infolge des verringerten Cholesteringehalts veränderten Membranfluidität (GYETVAI et al., 2006) spekuliert, die sich auf die Funktion von Rezeptoren oder membrangebundenen Rac-GAPs auswirken könnte (VECCHIONE und BRANDES, 2002).

Für die Befunde in Schweine-OL ist eine Verringerung des Cholesteringehaltes als Erklärung nicht ausreichend, da dieser nach 72 h Sst nur unwesentlich reduziert war. Denkbar wäre lediglich die fehlende Interaktion mit GDIs oder eine durch Statine bedingte kurzzeitige Veränderung der Membranfluidität (s. III.2.), die mit einer Zunahme der GTP-gebundenen Form kleiner GTPasen einhergehen könnte.

Neben RhoA, Rac und Cdc42 konnte vor kurzem ein weiteres Rho-Protein identifiziert werden, das nach ISHIKAWA et al. (2002) in OL angereichert und bei der Fortsatzbildung während der Myelinisierung von Bedeutung ist: RhoG. In PC12-Zellen scheint es für ein NGF-induziertes Fortsatzwachstum unabdingbar zu sein (KATOH et al., 2000). Hinsichtlich der Signalkaskade wurde dabei beschrieben, dass RhoG unterhalb von p21Ras lokalisiert ist und über eine Aktivierung von Rac1 und Cdc42 zum Fortsatzwachstum führt. Im Gegensatz dazu konnten konstitutiv aktivierte Formen von Rac1 und Cdc42 allein die Bildung von Fortsätzen nicht initiieren. Es wird davon ausgegangen, dass RhoG notwendig ist, um aktiviertes Rac1/Cdc42 an die Stellen der Zelle zu transportieren, an denen eine Fortsatzbildung und -verlängerung initiiert wird (KATOH et al., 2000). Eine direkte Interaktion mit Rac1/Cdc42-Effektoren wie z.B. PAK-1 (p21-aktivierte Proteinkinase) findet nicht statt (GAUTHIER-ROUVIÈRE et al., 1998); hingegen können andere Rac1/Cdc42-Effektoren wie z.B., MLK3 („mixed lineage kinase“) direkt mit RhoG-GTP interagieren (WENNERBERG et al., 2002).

Eine Expression von RhoG in Schweine-OL konnte im Western Blot nachgewiesen werden. Da GGPP für eine Prenylierung und Membranassoziation von RhoG notwendig ist, führte auch hier die Behandlung mit Sst zu einer Verschiebung von membrangebundenem RhoG ins Zytosol. Da ein erhöhter zytoplasmatischer Anteil bei

p21Ras eine verringerte, und bei RhoA eine erhöhte Aktivität nach sich zog, war die Bestimmung der Aktivität von RhoG von besonderem Interesse.

KATOH und NEGISHI (2003) konnten zeigen, dass RhoG in der GTP-gebundenen Form mit den Adaptorproteinen Elmo2 und Dock180 einen Komplex bildet und so Rac1 aktiviert. Elmo2 und Dock180 sind Säugerhomologe zu den *Chlostridium elegans* Genen ced-2, ced-5 und ced-10, die am „Rearrangement“ des Zytoskeletts beteiligt sind (GUMIENNY et al., 2001). Für die Bestimmung der Aktivität wurde deshalb versucht, eine Interaktion von RhoG-GTP mit Elmo2 darzustellen. Dazu sollte zelluläres RhoG-GTP (neben RhoG-GDP) zunächst an Anti-RhoG binden, das an ProteinA-Sepharose gekoppelt war. Bei Kontroll-OL konnte im anschließenden Western Blot an RhoG-GTP gebundenes Elmo2 durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu RhoA, Rac1 und Cdc42 resultierte die Behandlung von Schweine-OL mit Sst in einer verminderten Interaktion zwischen Elmo2 und RhoG, d.h. in weniger RhoG-GTP. Daraus ergibt sich die Frage, warum trotz der gestörten Interaktion mit GDIs ein im Gegensatz zu RhoA, Rac1 und Cdc42 verminderter GTP-gebundener Anteil von RhoG gefunden wurde. Eine durch fehlende Prenylierung verminderte Interaktion mit RhoGDI-3 (BRUNET et al., 2003) und der daraus resultierende mögliche spontane Austausch von GDP gegen GTP sowie das eventuelle Vorhandensein zytosolischer GEFs scheint hier keine Rolle zu spielen, wurde aber auch nicht untersucht. Zwar gibt es GEFs von RhoA (Dbl) und Rac1 (Vav1), die an RhoG binden, dort aber keinen GDP-GTP-Austausch bewirken (WENNERBERG et al., 2002). Weiterhin scheint eine Membranassoziation von RhoG für seine Aktivierung und die von Effektoren zwingend notwendig zu sein (GAUTHIER-ROUVIÈRE et al., 1998).

### **4.3 Rho-Proteine und Zytoskelett**

#### **4.3.1 RhoA**

Ob in Schweine-OL durch Zunahme von zytosolischem RhoA-GTP auch eine Aktivierung von Signalkaskaden stattfinden konnte, war zunächst unklar. Käme es allerdings zur Aktivierung von RhoA-GTP Effektoren, wäre dies ein starker Hinweis dafür.

Verschiedene Effektoren von RhoA konnten bereits identifiziert werden, dazu zählen auch die Rho-Kinasen ROCK I und II, wobei letztere besonders im Hirn angereichert ist

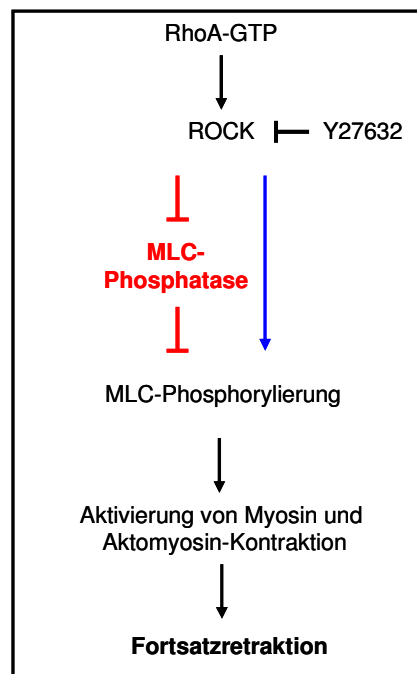


(LEUNG et al., 1996; TAKAI et al., 2001; MUELLER et al., 2005; BUDZYN et al., 2006). Die mit aktiviertem RhoA und ROCK einhergehenden morphologischen Veränderungen waren bereits an verschiedenen Zellspezies untersucht worden: In HeLa Zellen wurden verschiedene Konstrukte mit der Sequenz für normale und mutierte ROCK-Gene über Vektoren eingebracht, die zur Expression einer hyperaktiven oder aber einer inaktiven Form führten. Bei der hyperaktiven Form kam es zu Effekten auf Mikrofilamente, die mit einer Kondensation von Aktin und einem Abrunden der Zellen verbunden waren, dagegen führte eine inaktive Form von ROCK zum flächigen Auswachsen der Zellen (LEUNG et al., 1996). Dass eine Fortsatzretraktion mit der Aktivierung von ROCK einhergeht, konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden. In N1E-115 Neuroblastomzellen wurde in diesem Zusammenhang von einer Neurit-Retraktion gesprochen, und auch bei isolierten Stressfasern kam es infolge einer Aktivierung von ROCK zur Kontraktion (HIROSE et al., 1998; KATOH et al., 2001). Auch in OL-Vorläuferzellen wurde diese Beobachtung gemacht, eine Behandlung mit Lysophosphatsäure (LPA) führte über Aktivierung von ROCK bereits nach 20 min zur Fortsatzretraktion (DAWSON et al., 2003).

Bisher wurde davon ausgegangen, dass durch Statine infolge einer fehlenden Prenylierung der Rho/ROCK Signalweg gehemmt wird (RIKITAKE und LIAO, 2005; NOMA et al., 2006). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse (eine Erhöhung des Anteils an RhoA-GTP und die verringerte Interaktion mit RhoGDI) sowie Vergleiche mit den in der Literatur beobachteten morphologischen Auswirkungen von ROCK ließen dessen Aktivierung trotz fehlender Membranassoziation von RhoA vermuten. Eine Expression von ROCK in Schweine-OL ließ sich im Western Blot mit Hilfe eines monoklonalen ROCK-Antikörpers nachweisen. Dass es durch Hemmung von ROCK über Y27632 wie bei Schweine-OL zum Auswachsen von Fortsätzen kommt, wiesen auch WOLF et al. (2003) an primären Hirnkulturen der Maus nach, hingegen hatte konstitutiv aktives Rho-Protein eine Fortsatzretraktion zur Folge.

Mit Hilfe eines Aktivitätsassays konnte in Schweine-OL unter Sst eine Aktivierung von ROCK nachgewiesen werden. Eine bereits nach 24 h aufgetretene gesteigerte Aktivität geht mit dem Befund einher, dass zu diesem Zeitpunkt auch eine Erhöhung des RhoA-GTP-Levels zu verzeichnen war. Ungeklärt bleibt jedoch, wie die Aktivierung von ROCK trotz einer infolge der Sst-Behandlung verminderten Membranassoziation von RhoA erfolgt; eine Interaktion von ROCK mit zytosolischem RhoA-GTP scheint möglich zu sein.

Für eine durch ROCK ausgelöste Fortsatzretraktion gibt es in der Literatur postulierte Mechanismen, die in Abb. 60 zusammengefasst sind. Eine Aktivierung von ROCK bewirkt die Phosphorylierung leichter Myosinketten (MLC) über zwei mögliche Wege: Zum einen kann ROCK direkt MLC phosphorylieren, es kann aber auch MLC-Phosphatase phosphoryliert werden, die dadurch gehemmt wird (MELENDEZ-VASQUEZ, 2004). Neben ROCK können MLC auch direkt über die MLC-Kinase (MLCK) phosphoryliert werden. Ein Anstieg phosphorylierter MLC führt zur Aktomyosin-Interaktion und macht sich in einer Fortsatzretraktion bemerkbar (AMANO et al., 1993; HIROSE et al., 1998; DAWSON et al., 2003).



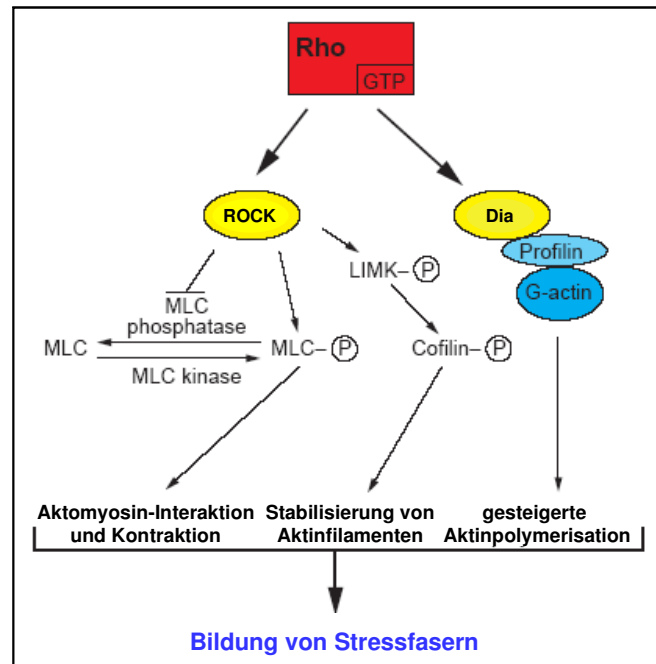
**Abb. 60: Modell des über ROCK vermittelten Mechanismus der Fortsatzretraktion.** In der aktivierten Form kann RhoA ROCK stimulieren, wodurch leichte Myosinketten (MLC) und/oder Myosinphosphatase phosphoryliert werden. Letzteres bewirkt eine Hemmung des Negativregulators der MLC-Phosphorylierung. MLC-Phosphorylierung bewirkt eine Induktion der Fortsatzretraktion. Eine Hemmung von ROCK durch Y27632 resultiert in einer verstärkten Fortsatzbildung.

Ob die Fortsatzretraktion der OL über eine Phosphorylierung von MLC läuft, wurde durch Nachweis phosphorylierter MLC untersucht. Im Western Blot ließ sich phosphorylierte MLC darstellen, nach Behandlung mit Sst war jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (0,5-72 h) eine Erhöhung gegenüber Kontrollbedingungen feststellbar. Auch eine Hemmung von ROCK durch Y27632 resultierte nicht in einer Verminderung des phosphorylierten MLC-Levels. Beide Ergebnisse lassen vermuten,

dass die Phosphorylierung von MLC für eine durch Sst ausgelöste Fortsatzretraktion nicht entscheidend ist. Andererseits kann nicht sichergestellt werden, ob der verwendete Antikörper wirklich alle phosphorylierten Stellen von MLC erkannte. Über eine MLC-unabhängige Fortsatzretraktion in NIH 3T3-Fibroblasten durch Aktivierung von ROCK berichteten auch NOBE et al. (2003); worüber eine Modulation der Kontraktilität erfolgte, blieb offen.

Unter Annahme einer unveränderten Phosphorylierung von MLC unter Sst ist auch eine über ROCK vermittelte Inserierung von Stressfasern an fokalen Adhäsionsstellen mit nachfolgender gestörter Adhäsion, Einziehen der Fortsätze und Abrunden der Zellen denkbar. Für die Zellmigration müssen Aktinfilamente über fokale Adhäsionsstellen mit der Plasmamembran verbunden sein, damit sich die durch Aktinpolymerisation und/oder Aktomyosin-Interaktion ausgelöste Retraktion in einer Zellbewegung bemerkbar macht (HU et al., 2007). Adhäsionsmoleküle wie z.B. Talin binden an Integrine, welche für eine Verknüpfung mit der extrazellulären Matrix wichtig sind (HOLLY et al., 2000; HYNES, 2002). Da eine Hemmung der Expression von Integrinen den pleiotropen Statineffekten zugeschrieben wird (GREENWOOD et al., 2006), lässt sich dadurch eine mögliche Erklärung für die bei OL beobachteten Effekte finden.

An der Fortsatzretraktion könnte neben ROCK auch ein kooperativer Signalweg beteiligt sein, bei dem über Rho-GTP „Dia“ aktiviert wird, das zu den Formin-homologen (FH) Proteinen zählt, welche am Aufbau von Aktinfilamenten und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind (WASSERMANN, 1998); über Interaktion mit Profilin und G-Aktin bewirkt „Dia“ eine vermehrte Aktinpolymerisation (Abb. 61) (FRAZIER und FIELD, 1997; NAKANO et al., 1999; WATANABE et al., 1999; BISHOP und HALL, 2000). Allerdings ist über eine ROCK-vermittelte Aktivierung von „Dia“ bei OL bisher nicht berichtet worden.



**Abb. 61: Signaltransduktionsweg der Rho-induzierten Bildung von Stressfasern.** Rho-GTP kann über Aktivierung von ROCK oder Dia die Bildung von Stressfasern initiieren. Neben einer möglichen Phosphorylierung von MLC kann ROCK auch LIMK aktivieren, welche durch Phosphorylierung des Aktinbindeproteins Cofilin eine Depolymerisation von Aktinmolekülen hemmt und dadurch eine Stabilisierung der filamentösen Aktinstruktur bewirkt (SUMI et al., 2001). Zusätzlich kann durch Interaktion von Rho-GTP mit Dia über Profilin und G-Aktin eine vermehrte Aktinpolymerisation stattfinden. Welche der Signalwege in OL bei der unter Sst zu beobachtenden Fortsatzretraktion ausschlaggebend sind, ist noch unklar. (BISHOP und HALL, 2000, mod.)

### 4.3.2 Rac1/Cdc42

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass Rac1 und Cdc42 die Fortsatzverlängerung und -verzweigung positiv regulieren (LIANG et al., 2004). Eine Notwendigkeit für die Fortsatzbildung konnte in OL-Vorläuferzellen gezeigt werden, bei denen konstitutiv aktive Formen von Rac1/Cdc42 bei gleichzeitig dominant negativem RhoA zur Fortsatzbildung führten, hingegen hatte konstitutiv aktives RhoA und dominant negatives Rac1/Cdc42 eine Hemmung der Differenzierung zur Folge (LIANG et al., 2004). THURNHERR et al. (2006) gelang es hingegen nicht, eine Notwendigkeit von Cdc42 für die oligodendrogliale Fortsatzbildung nachzuweisen. Hinsichtlich der Signalkaskade bleibt umstritten, ob Rac1 und Cdc42 in OL durch RhoG aktiviert werden (KATOH et al., 2000) oder aber unabhängig davon agieren (WENNERBERG et al., 2002).

Ein regulatorischer Einfluss von Rac1 und Cdc42 auf Effektoren des Zytoskeletts wurde nicht weiter untersucht; offen bleibt daher die Frage, ob durch Erhöhung des GTP-Levels dieser beiden GTPasen Signalkaskaden initiiert werden können, und inwieweit diese innerhalb einer nach Sst-Behandlung beobachteten Fortsatzretraktion relevant sind. Da in Schweine-OL nach Zugabe von Sst eine Aktivierung aller Formen (RhoA, Rac1 sowie Cdc42) nachgewiesen werden konnte, ist vielmehr anzunehmen, dass die Wirkung von RhoA auf Effektorproteine des Zytoskeletts gegenüber der durch Rac1 und Cdc42 vermittelten Bildung von Lamellipodien und Mikrospiques dominiert und eine Fortsatzretraktion initiiert. Auch eine gegenseitige Regulation der GTPasen wäre annehmbar. So wurde in Neuroblastomzellen davon berichtet, dass eine Stimulation von ROCK, welche mit einer Retraktion von Neuriten einhergeht, die Funktion von Rac1 und Cdc42 negativ reguliert (HIROSE et al., 1998). Gegen eine Negativregulation spricht der Befund, dass vermehrt Rac1-GTP und Cdc42-GTP gefunden wurden; ob allerdings darüber vermittelte Signalkaskaden durch ROCK gehemmt werden, bedarf weiterer Untersuchungen.

### 4.3.3 RhoG

Um zu untersuchen, ob RhoG für die Fortsatzbildung in Schweine-OL eine entscheidende Rolle spielt, wurden Zellen mit RhoG-siRNA transfiziert. 72 h nach erfolgter Transfektion konnte die Blockierung der Expression von RhoG im Western Blot gezeigt werden. Zum Zeitpunkt der ausgeschalteten Expression von RhoG war morphologisch kein Unterschied zu Kontrollen feststellbar, ein hemmender Effekt auf die Fortsatzbildung war nicht zu sehen. Demnach scheint RhoG für die Fortsatzbildung und -verlängerung nicht zwingend notwendig zu sein. Hier bleibt jedoch festzuhalten, dass für Transfektionsversuche OL verwendet wurden, die bereits vollständig differenziert waren. Ob daher RhoG bei OL-Vorläuferzellen essentiell ist, konnte nicht beurteilt werden. Es stellt sich zusätzlich die Frage, ob das Ausschalten eines Gens wie RhoG dramatische Effekte zur Folge haben muss. So berichteten VIGORITO et al. (2004), dass bei Mausmutanten ein „knock-out“ von RhoG, das auch in Lymphozyten angereichert ist und dort Gentranskription sowie Reorganisation des Zytoskeletts steuert, keine Veränderung der Entwicklung von T- und B-Lymphozyten nach sich zog. Auch in Untersuchungen von THURNHERR et al. (2006) machte sich ein „knock-down“ von Cdc42, welches an der Fortsatzbildung bei OL-Vorläuferzellen beteiligt ist,

in vitro nicht auf die morphologische Differenzierung dieser Zellen bemerkbar. Gerade bei dem komplexen System des Zytoskeletts und der Fortsatzbildung, bei dem zahlreiche Proteine und Signalkaskaden involviert sind, wäre ein Ausgleich einer verminderten RhoG-Expression durch Wirken anderer kleiner G-Proteine denkbar.

#### 4.4 Apoptose

In der Literatur lassen sich zahlreiche Belege dafür finden, dass die Behandlung mit Statinen bei Langzeitinkubation ein Absterben von Zellen nach sich zieht: 1-10  $\mu\text{M}$  Sst führten bei OL-Vorläuferzellen von Mensch und Ratte nach 4 Tagen sowie bei reifen humanen OL nach 8 Tagen zu einer Zunahme der Zelltodrate (MIRON et al., 2007); PC12-Zellen starben bereits 36 h nach Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Sst (KUMANO et al., 2000). Vermutlich führt u.a. eine durch Statine ausgelöste Veränderung der Permeabilität von Mitochondrien zum Zelltod (VELHO et al., 2006). In C6-glialen Zellen, die 24 h nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin begannen abzusterben, wurde die Zytotoxizität auf eine unspezifische Hemmung der Funktion prenylierter Proteine zurückgeführt (CHOI und JUNG, 1999).

Bei Inkubation von Schweine-OL mit Sst kam es zur Zunahme der Zelltodrate. Nach 72 h Sst waren ~15 % der Zellen apoptotisch, was mit dem Befund einherging, dass sich nach diesem Zeitraum nur wenige OL immunzytochemisch hinsichtlich einer Aktivierung von Caspase-3 anfärben ließen. Eine durch Statine ausgelöste Apoptose durch Aktivierung der Caspase-Kaskade wurde bereits bei einer Reihe von Zellsystemen beobachtet. Die Behandlung mit Sst ging in der Ratte bei glatten Muskelgefäßzellen oder aber auch mikrovaskularen Endothelzellen der Lunge mit einer Aktivierung von Caspase-3 einher (CHENG et al., 2003; COOL et al., 2006). Über diese Signalkaskade fand auch in Perizyten unter Sst, Lovastatin und Mevastatin eine Induktion der Apoptose statt (BOUCHER et al., 2006). Kleine G-Proteine können an einer Induktion der Apoptose beteiligt sein, z.B. kann über ROCK die Caspase-Kaskade aktiviert werden (SHI und WEI, 2007).

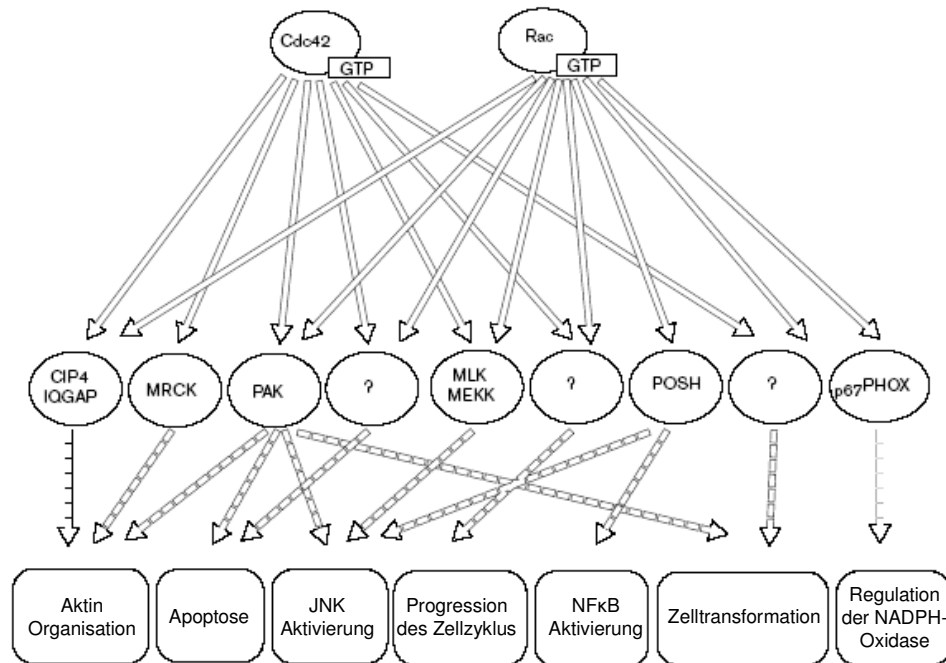
Zusätzlich kann die Beteiligung eines anderen apoptotischen Weges, wie z.B. über oxidativen Stress, nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.4.1 Aktivierung von SAPK via RhoA und Rac1/Cdc42

Die Initiation von Apoptose in OL kann mit einer Aktivierung von SAPK/JNK einhergehen, wie u.a. JUREWICZ et al. (2003) berichteten; TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ ) führte dabei zur Phosphorylierung von c-Jun. Auch unter Statinen scheint neben einer Induktion der Caspase-Signalkaskade eine Aktivierung von SAPK zu erfolgen. Eine Phosphorylierung von c-Jun fand in C6-Gliomzellen infolge einer Behandlung mit Sst statt, die Aktivierung von ERK1/2 blieb dabei unverändert (KOYUTURK et al., 2004).

Neben einer Regulation zytoskeletaler Strukturen können Mitglieder der Rho-Familie die Aktivierung der SAPK/JNK steuern. Über eine Beteiligung kleiner G-Proteine an der Phosphorylierung von c-Jun berichteten MARINISSEN et al. (2004): Durch Aktivierung von ROCK ist RhoA in der Lage, SAPK/JNK zu aktivieren. Weiterhin können Rac1 und Cdc42, neben dem Einfluss auf die Regulation von Strukturen des Zytoskeletts, an einer Induktion der stressaktivierten Proteinkinase (SAPK) beteiligt sein (Abb. 62) (KYRIAKES et al., 1994; COSO et al., 1995; MINDEN et al., 1995).

Auch bei Schweine-OL war nach Behandlung mit Sst eine Aktivierung der SAPK nachweisbar. Ein über RhoA und/oder Rac1/Cdc42 laufender Weg wäre daher denkbar. Die Grundlage dafür wäre jedoch eine hohe Affinität der aktivierten, zytoplasmatisch lokalisierten GTPasen zu Effektoren der Signalkaskaden.



**Abb. 62: Rac/Cdc42-regulierte Signalkaskaden.** Rac und Cdc42 können, abhängig von der Zellspezies, in ihrer aktivierten (GTP-gebundenen) Form eine Vielzahl von Signalkaskaden initiieren, zu denen u.a. die Aktivierung von JNK zählt. Bei den durch unterbrochene Pfeile dargestellten Effekten (links und rechts außen) ist der genaue Weg, über den das Effektorprotein eine Wirkung hervorruft, noch nicht genau geklärt (ASPENSTRÖM, 1999, mod.).

## 4.5 Myelinproteine

Über den p21Ras-MAPK Signalweg werden ERK1/2 aktiviert, die nach Translokation in den Zellkern Mitglieder der ternären Komplexfaktoren (TCF) phosphorylieren und die Genexpression steuern; es kommt dabei u.a. zur Expression von c-Fos (BHAT et al., 1992; STARIHA und KIM, 2001). Eine Zugabe von NGF, das ERK1/2 aktiviert, ging mit einer gesteigerten Synthese von MBP und PLP einher (ALTHAUS et al., 1997; ALTHAUS, 2004). Auch durch Stimulation von ProteinkinaseC, die ERK1/2 aber auch direkt c-fos aktivieren kann, kam es zu einer gesteigerten Synthese von Myelinproteinen. BHAT und ZHANG (1996) zeigten am Gehirn der Maus, dass ERK1/2 in Myelin vorhanden sind, und die darüber vermittelte Phosphorylierung von MBP in frühen Stadien der Myelinisierung während der Entwicklung, aber auch für die Reinitiation der Myelinisierung bei reifen OL eine Rolle spielt.

Sst führte über Hemmung von p21Ras zu einer signifikanten Reduktion der ERK1/2-Aktivität, eine Beeinträchtigung der Synthese von Myelinproteinen war daher denkbar. Um dies zu untersuchen, wurde die Expression von MBP, PLP und CNP über den



Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in neu synthetisierte Proteine verfolgt, da kultivierte Schweine-OL bereits vollständig ausgereift und differenziert sind und diese drei Myelinproteine bereits exprimieren. Für alle untersuchten Proteine war die Synthese infolge einer Sst-Applikation vermindert. Warum der prozentual verminderte Anteil an neu synthetisiertem CNP gegenüber MBP und PLP am geringsten war, bleibt offen. CNP macht etwa 4 % der Myelinproteine aus, der im Autoradiogramm gemessene Unterschied zur Kontrolle fällt daher möglicherweise geringer aus als für MBP und PLP, hinzu kommt eine methodische Schwierigkeit bei der Quantifizierung insgesamt relativ schwacher Banden über Scion Image.

Diesen Ergebnissen stehen Daten von PAINTLIA et al. (2005) gegenüber, bei denen 1  $\mu\text{M}$  Lovastatin zu einer gesteigerten Synthese von MBP und PLP, hingegen nicht von MOG und MAG führte, wenn EAE-Tiere mit Lovastatin behandelten EAE-Tieren verglichen wurden. Unterstützt wurden diese Befunde durch ähnliche Ergebnisse an Zytokin-aktivierten gemischten glialen Kulturen. Da allerdings bei diesen glialen Mixkulturen unter Zugabe eines Zytokin-Cocktails gearbeitet wurde, lässt sich nicht eindeutig sagen, ob tatsächlich Lovastatin für eine gesteigerte Myelinproteinsynthese verantwortlich ist. Ein mit unseren Ergebnissen einhergehender Befund wurde von LANGAN und VOLPE (1987) berichtet, dabei führte Lovastatin in einer glialen Mixkultur zu einer verminderten Induktion von CNP.

Neben einer reduzierten MAPK-Aktivität durch Hemmung von p21Ras könnte ein weiteres kleines G-Protein zu einer verminderten Myelinisierung unter Sst beitragen: RhoG. Kinectin wurde neben Elmo2 als ein weiteres Effektormolekül von RhoG in Fibroblasten von Rattenembryonen (REF52-Zellen) und der Meerkatze (COS-7 Zellen) identifiziert (VIGNAL et al., 2001). Als Ankerprotein bindet Kinectin an Kinesin, welches zu einer Gruppe von Motorproteinen gehört und durch Entlangwandern an Mikrotubuli-Filamenten am intrazellulären Transport von z.B. Vesikeln und Zellorganellen beteiligt ist (ONG et al., 2000). In REF52- und COS-7-Zellen verstärkte eine Bindung von RhoG-GTP an Kinectin die ATPase-Funktion von Kinesin. Auch wenn diese Interaktion für die Fortsatzbildung nicht relevant ist, kommt dem Transport von Molekülen innerhalb der Zelle eine große Bedeutung zu. So konnte durch Mikroinjektion von MBP-mRNA in OL gezeigt werden, dass intakte Mikrotubuli- und Kinesinstrukturen für den Transport von MBP-mRNA zur Myelinmembran benötigt werden (CARSON et al., 1997).

Eine durch Sst verringerte Aktivität von RhoG in OL könnte daher zu einer verringerten Myelinisierung beitragen. Eine Analyse der Interaktion von RhoG mit Kinectin vor und nach Behandlung mit Sst hätte diese Fragestellung komplementiert und wäre somit ein Aspekt zukünftiger Forschung.

#### **4.6 Proteinexpression unter Sst und Phosphorylierung von Akt**

Dass Statine die Genexpression kleiner GTPasen beeinflussen, wurde bereits in Endothelzellen der Rinderaorta gezeigt (LAUFS et al., 2000): Die Behandlung mit verschiedenen Statinen (Atorvastatin, Mevastatin, Lovastatin und Sst) hatte dabei eine gesteigerte Proteinexpression von RhoA zur Folge, das infolge der fehlenden Prenylierung im Zytosol akkumulierte. Als Grundlage der induzierten Genexpression wurde dabei eine „Feedback-Regulation“ zytoskeletaler Strukturen diskutiert.

Unter Sst war die Proteinexpression von RhoA und RhoG erhöht, einzig der Anteil an p21Ras war verringert. Ein von HOLSTEIN et al. (2002) unter Lovastatin dargestellter Anstieg des Proteinlevels von RhoB in K562-Zellen wurde auf eine verlängerte Halbwertszeit des Proteins sowie eine Erhöhung der mRNA-Level zurückgeführt; über welchen Signalweg ein erhöhter Proteinlevel mediiert wird, blieb offen. Eine in OL unter Sst beobachtete Phosphorylierung von Akt wäre als Ursache für einen Anstieg der Proteinlevel von RhoA und RhoG denkbar. Neben einer Regulation von z.B. Apoptose oder Zellzyklus könnte Akt durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren ebenfalls die Expression von Genen induzieren (DATTA et al., 1999; BRAZIL et al., 2004).

Eine Aktivierung von Akt, die bereits 15 min nach Zugabe von 1-10  $\mu$ M Sst in OL sichtbar war, konnten bereits KUREISHI et al. (2000) an HUVEC-Zellen zeigen. Das Maximum der Phosphorylierung wurde dabei 1 h nach Zugabe von Sst gemessen und erreichte nach 21 h wieder Kontrollniveau. Warum der Sst-induzierten Phosphorylierung von Akt durch Mevalonat entgegengewirkt werden konnte, wurde nicht erwähnt. Da eine Aktivierung von Akt nach so kurzer Zeit auftrat, lässt sich eine Beteiligung kleiner G-Proteine via fehlender Prenylierung vermutlich ausschließen. Über den zugrunde liegenden Mechanismus der Akt-Phosphorylierung wurde von KUREISHI et al (2000) nur spekuliert; eine durch PI3-Kinase erfolgende Aktivierung wurde angenommen, da die über Sst erfolgte Phosphorylierung durch Wortmannin, einem PI3-Kinase-Inhibitor, kompensiert werden konnte. Zu einem derartigen

Kurzzeiteffekt infolge einer Statin-Behandlung kam es auch bei BAEC-Zellen; unter 10  $\mu$ M Lovastatin war die Phosphorylierung der Nitritoxid-Synthase (eNOS) bereits nach 1 min erhöht, was auf eine Aktivierung von PI3-Kinase zurückgeführt wurde (HARRIS et al., 2004). Ein über Hemmung der HMG-CoA Reduktase stattfindender Mechanismus wurde ausgeschlossen, da Mevalonat einer eNOS-Aktivierung nicht entgegenwirken konnte.

Zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt durch Sst kam es auch bei Schweine-OL 2 h nach Zugabe von Sst. Für eine Aktivierung von Akt nach diesem kurzen Zeitraum könnte die unter III.2. beschriebene Änderung der Membranfluidität verantwortlich sein, infolge der es zu einer kurzfristigen Dimerisierung von Rezeptoren wie TrkA und einer Aktivierung von PI3-Kinase kommen könnte.

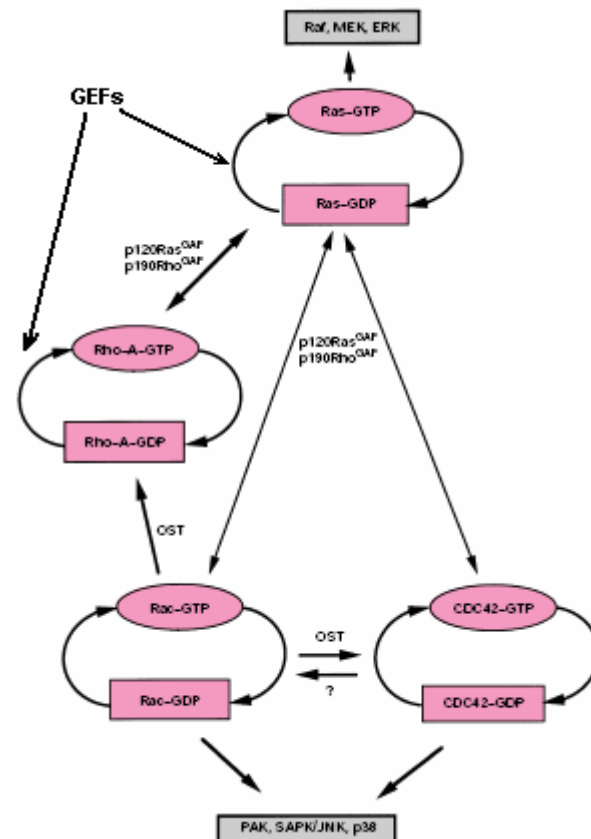
Im Gegensatz zu dem von KUREISHI et al. (2000) beobachteten Verlauf der Phosphorylierung sank die Aktivität von Akt in Schweine-OL jedoch nach 24 h wieder unter das Kontrollniveau. Wenn die Stimulation von Akt über PI3-Kinase induziert wird, ist davon auszugehen, dass darüber vermittelte Signalkaskaden durch Langzeitinkubation mit Sst gehemmt werden. Diese Vermutung wird durch Befunde unserer Arbeitsgruppe gestützt, die eine Notwendigkeit der über PI3-Kinase vermittelten Signalkaskaden für das Überleben von OL und die Fortsatzbildung zeigten (ALTHAUS et al., 1992; HEMPEL, 1998; ALTHAUS und RICHTER-LANDSBERG, 2000).

#### **4.7 „Cross-talk“ zwischen kleinen G-Proteinen**

Durch kleine G-Proteine ausgelöste Signalkaskaden sind hinsichtlich ihrer Effektorfunktionen nur unvollständig bekannt. Zudem wird ein „cross-talk“ zwischen den Mitgliedern der kleinen G-Proteine beschrieben, wodurch sich Möglichkeiten der gegenseitigen Regulation ergeben (Abb. 63) (DENHARDT, 1996; BAR-SAGI und HALL, 2000; SAHAI et al., 2001). Eine Zuordnung auftretender Effekte zur Aktivierung oder Hemmung bestimmter GTPasen ist deshalb nicht nur allgemein, sondern auch bei OL relativ schwierig. So wird in der Literatur beschrieben, dass Cdc42 in verschiedenen Zelltypen Rac aktivieren kann, welches des Weiteren in der Lage ist, Rho zu aktivieren oder zu hemmen (RIDLEY et al., 1992; NOBES und HALL, 1995; SANDER et al., 1999). Es gibt jedoch kein Beispiel für eine Aktivierung von Ras durch Rho. Hingegen wird von einem hemmenden Effekt von Ras auf Effektoren von Rho

berichtet. Mit onkogenem Ras transformierte Swiss-3T3-Zellen zeigten eine verminderte Aktivität der Rho-Kinase (SAHAI et al., 2001). Eine gegenseitige Deaktivierung wurde an Fibroblasten gezeigt, bei denen das Ras-deaktivierende Protein p120RasGAP mit dem Rho-deaktivierenden Protein p190RhoGAP komplexieren konnte, was eine Inaktivierung beider GTPasen zur Folge hatte (McGLADE et al. 1993; BAR-SAGI und HALL, 2000). Neben einer gegenseitigen Negativregulation kann auch eine gleichzeitige Aktivierung stattfinden, zwei wichtige Ras-GEFs (SOS und Ras-GRF) enthalten eine RhoGEF-Domäne und könnten somit Rho-Proteine simultan aktivieren.

Auch über eine mögliche Negativregulation von RhoG durch RhoA wird berichtet: In Fibroblasten von Maus und Ratte kam es zu einer über RhoA vermittelten Kontraktion durch Bildung von Stressfasern und Depolymerisation von Mikrotubuli (ZHANG et al., 1997). Da RhoG einen Mikrotubuli-abhängigen Transport zur Translokation an die Zellmembran, wo der Austausch zu GTP stattfindet, benötigt, könnte so eine Aktivierung von RhoG verhindert werden (GAUTHIER-ROUVIÈRE et al., 1998).



**Abb. 63: Potentielle Interaktionen kleiner G-Proteine.** Die GTP-gebundene und aktivierte Form einer GTPase kann durch Interaktion mit einem entsprechenden GEF oder GAP die Aktivierung oder Hemmung eines anderen kleinen G-Proteins bewirken. Durch Interaktion von p120RasGAP und

p190RhoGAP kann die Inaktivierung von Ras mit einer Hemmung von RhoA, Rac sowie Cdc42 einhergehen. Ost (Onkogen aus Ratten-Osteosarkom-Zellen) interagiert mit Rac1-GTP und ist ein GEF für RhoA und Cdc42 (RIDLEY, 1995). SOS und Ras-GRF, zwei GEF-Proteine für Ras, enthalten eine GEF-Domäne für Rho-Proteine und können diese gleichzeitig aktivieren. (DENHARDT, 1996, mod.)

#### **4.8 OL – Sst – Kleine G-Proteine im Überblick**

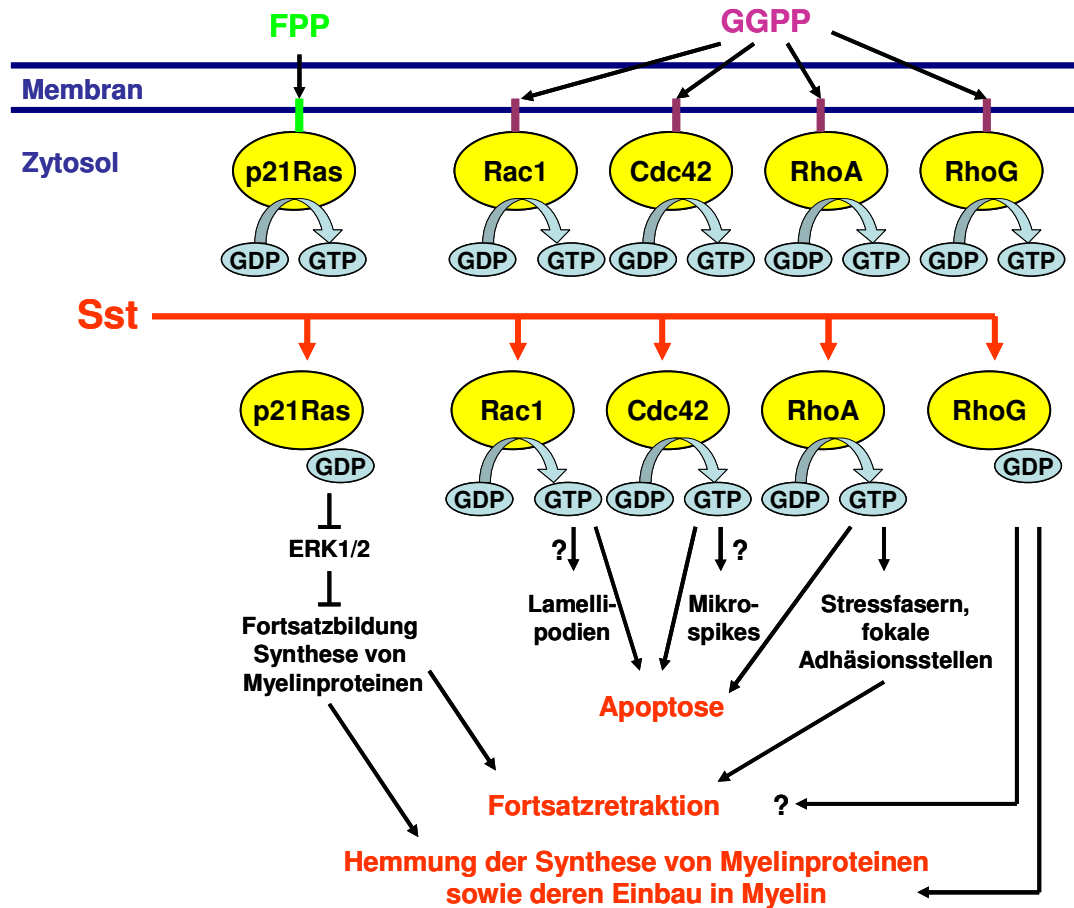
Infolge einer Sst-Behandlung begann in OL 48 h nach Zugabe eine lichtmikroskopisch sichtbare Fortsatzretraktion; im weiteren Verlauf retrahierten gebildete Fortsätze vollständig, zusätzlich kugelten sich OL ab und begannen sich vom Boden der Kulturschale abzulösen. Dass diesen morphologischen Veränderungen durch FPP und GGPP entgegengewirkt werden konnte, implizierte eine Beteiligung kleiner G-Proteine (Abb. 64).

Infolge einer fehlenden Prenylierung war die Membranassoziation von p21Ras, RhoA und RhoG gestört. Bei p21Ras führte dies zu einer Beeinträchtigung der darüber laufenden Aktivierung des MAPK-Signalweges und einer damit verbundenen verminderten Synthese von Myelinproteinen.

RhoG wird als in OL angereichert berichtet. Eine gegenüber Kontrollen schwächere Interaktion von RhoG mit dem Effektor Elmo2, der RhoG-GTP erkennt, wies auf eine unter Sst geringere RhoG-GTP Konzentration hin. Über „knock-down“ von RhoG durch Transfektion ließ sich keine zwingende Notwendigkeit für die Fortsatzbildung in differenzierten OL nachweisen. Eine Störung des über RhoG laufenden Vesikeltransports, über den auch MBP-mRNA zum Myelin befördert wird, könnte allerdings zu einer verminderten Myelinisierung beitragen.

Im Gegensatz zu p21Ras und RhoG ging die Sst-Behandlung erstaunlicherweise mit einer Erhöhung der GTP-gebundenen Formen von RhoA, Rac1 und Cdc42 einher. Gründe hierfür könnten die fehlende Interaktion mit RhoGDIs mangels Prenylierung und der daraus resultierende spontane Austausch gegen GTP, eine zur Aktivierung nicht zwingende Membranassoziation sowie das Wirken unspezifischer oder zytosolischer GEFs sein. Im Gegensatz zu bisherigen Annahmen wurde ROCK unter Sst über RhoA-GTP aktiviert.

Über Cdc42 gebildete „Mikrospikes“ fehlten vollständig, was eine Inaktivierung des dazu führenden Signalweges impliziert. Weiterhin könnten Rac1 und Cdc42 an einer durch Sst ausgelösten Aktivierung der SAPK beteiligt sein.



**Abb. 64: Postulierte Mechanismen der durch Sst hervorgerufenen Effekte in Schweine-OL.** Infolge einer durch Sst-Behandlung hervorgerufenen Hemmung der Prenylierung kleiner G-Proteine akkumulierten diese im Zytosol. p21Ras war nicht mehr in der Lage, ERK1/2 zu aktivieren, was zur Fortsatzretraktion und Hemmung der Synthese von Myelinproteinen führte. Rho-Proteine konnten via fehlender Prenylierung nicht mehr mit GDIs interagieren; über zytosolische GEFs, fehlende Interaktion mit GAPs oder spontanen Austausch von GDP gegen GTP führte dies zu einem Anstieg der aktivierten Formen von RhoA, Rac1 und Cdc42. RhoA-GTP aktiviert ROCK, das vermutlich über Bildung von Stressfasern und deren Inserierung an fokalen Adhäsionskontakten zur Fortsatzretraktion führte. An einer Initiation der Apoptose sind wahrscheinlich neben RhoA-GTP auch Rac1-GTP und Cdc42-GTP beteiligt; lichtmikroskopisch waren unter Sst keine „Mikrospeikes“ mehr erkennbar. Einzig für RhoG wurde eine gestörte Interaktion mit dem Effektor Elmo2 nachgewiesen. Eine Bedeutung von RhoG für das Fortsatzwachstum konnte nicht nachgewiesen werden, eine Störung des Transports von MBP-mRNA zum Myelin aber denkbar.

## 5. Wirkung von Simvastatin auf primär kultivierte Mäuse-Oligodendrozyten

Für die in dieser Arbeit geplanten in vivo Untersuchungen an C75BL/6N Mäusen war Voraussetzung, dass die in vitro beobachteten Sst-Effekte in Schweine-OL denen von kultivierten Mäuse-OL ähneln. Für einen derartigen Vergleich wurden drei Kriterien gewählt: Morphologische Veränderungen, Hemmung der Cholesterinsynthese und Aktivität der MAPK ERK1/2.

Dies war insofern wichtig, da sich in der Literatur Hinweise finden ließen, dass im Zuge einer Sst-Behandlung bei Mäusen die Expression der HMG-CoA Reduktase gesteigert wird, um dem inhibitorischen Effekt entgegenzuwirken. Es wurde davon berichtet, dass die Behandlung mit 100 mg Sst/kg b.wt. nach 3 Tagen zu keiner signifikanten Veränderung des Cholesterinspiegels im Gehirn führte, einzig die Synthese des Vorläufermoleküls Lathosterol war vermindert (THELEN et al., 2006). Gleichzeitig wurde aber eine Erhöhung der HMG-CoA Reduktase-mRNA um 60 % beobachtet. Dies hätte zur Folge, dass die Funktion kleiner GTPasen nicht beeinflusst wird. Hingegen berichteten JOHNSON-ANUNA et al. (2005), dass der Cholesteringehalt im zerebralen Kortex von C57BL/6 Mäusen, denen 21 Tage bei täglicher oraler Applikation 50 mg Sst/kg b.wt. verabreicht wurden, um 13 % verringert war. Eine gestiegene Expression der HMG-CoA Reduktase wurde dabei nicht festgestellt.

Die bei kultivierten OL von C57BL/6N Mäusen unter Sst beobachteten morphologischen Veränderungen waren mit denen bei Schweine-OL vergleichbar: Fortsätze retrahierten, OL rundeten sich ab und begannen sich vom Boden der Kulturschale abzulösen. Da in der Kultur noch ein höherer Prozentsatz an Fremdzellen zu sehen war, erfolgte der Nachweis von OL immunzytochemisch über Darstellung von MOSP. Damit wurde sichergestellt, dass sich die beobachteten morphologischen Veränderungen auf OL bezogen. Bemerkenswert war die gegenüber Schweine-OL erhebliche Reduktion des Cholesterinspiegels, die 72 h nach Zugabe von Sst (5  $\mu$ M) ca. 45 % betrug. Warum ein so großer Unterschied zu Schweine-OL bestand ist unklar, eine mögliche Ursache wäre das verschiedene Reifestadium der OL. Während es sich beim Schwein um adulte, vollständig differenzierte OL handelte, wurden Mäuse-OL aus Embryonen des Stadiums E15-E17 isoliert. Eine mögliche Erklärung wäre daher, dass

die Störung einer hohen Cholesterinsyntheserate in diesem Stadium stärker zu Buche schlägt.

Da die Aktivität von ERK1/2 um ca. 45 % verringert wurde, war ein weiteres wichtiges Kriterium für die in vivo Analyse des Sst-Einflusses auf Mäuse-OL erfüllt.

## **6. Einfluss von Simvastatin auf die Remyelinisierung in vivo**

In der Literatur lassen sich eine Reihe von Hinweisen finden, dass lipophile Statine wie Sst für die Wirksamkeit als Inhibitor der HMG-CoA Reduktase im Gehirn die Blut-Hirnschranke in einem therapeutisch relevanten Ausmaß passieren können (FASSBENDER et al., 2002; GERTZ et al., 2003; KIRSCH et al., 2003). Auch in dem experimentell herangezogenen EAE-Modell, bei dem eine T-Zell vermittelte Immunantwort im Gehirn mit einer Demyelinisierung einhergeht (RIVERS et al., 1933; IGLESIAS et al., 2001; BUDDEBERG et al., 2004; GOLD et al., 2006), wird z.T. von einem Passieren der Blut-Hirnschranke ausgegangen. So wurde z.B. über eine Wirksamkeit von Lovastatin im EAE-Modell der Ratte berichtet; neben einer Reduktion von Genen der Immunantwort, was in einer verminderten Infiltration von Immunzellen in das lumbale Rückenmark resultierte, schien die tägliche Applikation von 2 mg Lovastatin/kg b.wt. zusätzlich das Überleben und die Differenzierung von OL-Vorläufern zu verbessern (PAINTLIA et al., 2004; PAINTLIA et al., 2005). Über eine Reihe indirekter Methoden und Ergebnisse wurde dabei ein für die Remyelinisierung nützlicher Effekt von Lovastatin beschrieben.

### **6.1 Cuprizin-Modell – Demyelinisierung**

Während der Focus beim EAE-Modell mehr auf der immunologischen Seite liegt, ist das Cuprizin-Modell besser geeignet, um den Effekt von Sst auf die Remyelinisierung zu untersuchen. Bei der Anwendung einer Cuprizin-Diät kommt es in C57BL/6N Mäusen zur Schädigung von OL (BLAKEMORE, 1973; KOMOLY et al., 1987; MATSUSHIMA und MORELL, 2001). Warum durch Cuprizin, einem Kupferchelator, präferiert OL betroffen sind, ist noch nicht genau geklärt. Einer Hypothese zufolge ist eine für die Aufrechterhaltung von Myelin benötigte hohe Stoffwechselrate in Mitochondrien von OL eine mögliche Erklärung (MATSUSHIMA und MORELL, 2001). Infolge einer Diät mit Cuprizin bzw. nach Absetzen kommt es zu einer De- und



Remyelinisierung, die vorwiegend im Bereich des corpus callosum stattfindet; im Gegensatz dazu sind Ausmaß und Lokalisation der Läsionen im EAE-Modell von Tier zu Tier variabel und nicht vorhersehbar. Mikrogliazellen sind die einzig in einer durch Cuprizon hervorgerufenen Läsion anwesenden immunologisch wirksamen Zellen, weshalb sich das Modell explizit zur Beurteilung von Remyelinisierungsprozessen eignet (MATSUSHIMA und MORELL, 2001).

In Anlehnung an Daten aus der Literatur erfolgte die Cuprizon-Diät für 6 Wochen, eine nach Absetzen von Cuprizon beginnende Remyelinisierung sollte nach weiteren 6 Wochen nahezu vollständig abgeschlossen sein (MERKLER et al., 2005). Da bei Beurteilung der De- und Remyelinisierung über Score-Bestimmung des durch LFB-PAS angefärbten Myelins quantitative Unterschiede nur relativ grob registriert werden können, wurde zusätzlich eine exakte Vermessung von Axonen und den dazugehörigen Myelinschichten über TEM vorgenommen.

## 6.2 Sst-Konzentrationen

Nach Absetzen von Cuprizon wurde Sst in verschiedenen Konzentrationen täglich oral appliziert: 1, 10 sowie 50 mg/kg b.wt. Die in der Literatur aufgeführten angewandten Sst-Konzentrationen reichen bis 500 mg/kg b.wt.; selbst diese sehr hohe Konzentration war über einen Anwendungszeitraum von 30 Tagen bei CD-1 Mäusen nicht lethal (DÍAZ-ZAGOYA et al., 1999). Für die Untersuchung von Sst-Effekten auf cholesterinhaltige Mikrodomänen in der Plasmamembran des Gehirns wurde Sst C57BL/6J Mäusen in einer Konzentration von 50 mg/kg b.wt. für 23 Tage oral appliziert (KIRSCH et al., 2003). Eine Reduktion von freiem (nicht verestertem) Cholesterin sowie eine Veränderung der Cholesterinverteilung innerhalb der synaptosomalen Membran waren Folgen der Behandlung. CHEN et al. (2002) beobachteten antiinflammatorische, antiproliferative und proapoptotische Mechanismen, die zur Verhinderung einer Restenose relevant sind, bei subkutaner Verabreichung von 2 mg Sst/kg b.wt. (Niedrigdosierung) und 20 mg Sst/kg b.wt. (Hochdosierung) bei C57BL/6J Mäusen. Die in unseren Versuchen angewendeten Konzentrationen erschienen deshalb als sinnvoll, da neben der therapeutischen Dosis von täglich 10 mg/kg b.wt. eine geringere (1 mg/kg b.wt.) sowie eine höhere (50 mg/kg b.wt.) Sst-Konzentration eingesetzt wurden.

Hinsichtlich der Bioverfügbarkeit wird angegeben, dass beim Mensch ca. 5 % einer oral verabreichten Dosis Sst als aktiver HMG-CoA Reduktase-Hemmer den Blutkreislauf erreichen (STANCU und SIMA, 2001); bei einer einmaligen Dosis von 80 mg Sst wären dies ca. 800 µg/l. Mit einer Eliminations-Halbwertszeit von ca. 2 h (VREE et al., 2001) lagen die beim Mensch 4 h nach einer oralen Applikation maximal erreichten Plasmakonzentrationen (CORSINI et al., 1999) mit 3 µg/l (20 mg Sst, OCHIAI et al., 1997) bzw. 10 µg/l (80 mg Sst, VREE et al., 2001) deutlich unter der oben angegebenen Bioverfügbarkeit. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich u.a. auf die Absorptionsrate, die individuell zwischen 30 % und 98 % schwankt (CORSINI et al., 1999). Trotz der geringen Bioverfügbarkeit reichten die verabreichten Dosen aus, um eine Hemmung der HMG-CoA Reduktase zu bewirken: die Plasmakonzentrationen waren deutlich höher als der  $K_i$ -Wert, der für den Statin-Enzym-Komplex zwischen 0,1 und 2,3 nM liegt. Infolge der lipophilen Eigenschaften war davon auszugehen, dass auch im Hirn eine effektive Sst-Konzentration erreicht wurde, die unter pathologischen Bedingungen einer MS, bei der die Blut-Hirnschranke lokal permeabel ist, wahrscheinlich noch höher liegt.

### **6.3 Demyelinisierung unter Cuprizone und Remyelinisierung unter Sst – Morphologie**

Die für eine Analyse der Remyelinisierung vorausgesetzte Demyelinisierung konnte nach 6-wöchiger Cuprizone-Diät lichtmikroskopisch nachgewiesen werden; mit einem Score von 0 in der LFB-PAS Färbung war eine nahezu komplette Entmarkung erkennbar. In der TEM machte sich dies durch einen massiven Myelinverlust bemerkbar, neben unbemerkten Axonen waren aber auch noch einzelne myelinisierte zu sehen.

Schon in der ersten Versuchsreihe, bei der die Beurteilung einer Remyelinisierung über LFB-PAS Färbung erfolgte, zeichnete sich ab, dass die Behandlung mit Sst (1, 10 und 50 mg/kg b.wt.) zu einer verminderten Remyelinisierung führte. Während Kontrolltiere 2 Wochen nach Absetzen von Cuprizone schon eine deutliche Remyelinisierung zeigten, war unter Sst kaum eine Verbesserung erkennbar. In den folgenden zwei Wochen fand jedoch auch bei diesen Tieren eine Remyelinisierung statt. Bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt der ersten Serie (4 Wochen) zeigten Tiere unter Sst eine verminderte Remyelinisierung, wobei der stärkste hemmende Effekt bei der

höchsten Dosierung auftrat. Eine Tendenz der Einflussnahme von Sst auf die Remyelinisierung war nach LFB-PAS erkennbar, genauere quantitative Daten wurden jedoch in einer zweiten Serie elektronenmikroskopisch ermittelt; dabei wurden die eingesetzten Konzentrationen und Behandlungszeiträume entsprechend den Ergebnissen der ersten Serie verändert. Es erschien sinnvoll, die Beobachtungsperiode unter Sst auf 6 Wochen auszudehnen, da die Remyelinisierung bei Kontrolltieren 6 Wochen nach Absetzen von Cuprizon nahezu vollständig abgeschlossen sein sollte. Aus versuchstechnischen Gründen wurden nur zwei Sst-Konzentrationen, nämlich 10 und 50 mg/kg b.wt., angewendet. Über Ausmessen von Axonen und Myelin ergaben sich eindrucksvolle Resultate: Einhergehend mit Daten der Literatur waren nach 6-wöchiger Cuprizon-Diät rund zwei Drittel der Axone demyelinisiert (MERKLER et al., 2005). Dass keine, wie über LFB-PAS dargestellte komplette Demyelinisierung nachweisbar war, liegt darin begründet, dass bei der TEM anstatt der lateralen die medialen Bereiche des corpus callosum ausgewertet wurden, die auch bei LFB-PAS nach 6 Wochen Cuprizon noch Myelin aufwiesen. In diesen Kontrolltieren waren 3 Wochen nach Absetzen der Cuprizon-Diät wieder ~66 % der Axone myelinisiert; nach insgesamt 6 Wochen waren diese Tiere hinsichtlich der Myelinisierung den „age-matched“ Kontrollen ähnlich (~89 % myelinisierte Axone). Eine in Sst-behandelten Tieren stattgefundenene Remyelinisierung, die, wie bereits über LFB-PAS Färbung detektiert, nach dreiwöchiger Sst-Applikation deutlich verzögert war, verbesserte sich in den folgenden drei Wochen nur unwesentlich: Im Vergleich zu 3 Wochen Sst (~52 % myelinisierte Axone) betrug der Anteil der myelinisierten Fraktion nach 6 Wochen Sst ~56-58 %.

Eine weitere Interpretation der Remyelinisierung ergibt sich zusätzlich über die G-ratio, dem Verhältnis von Axon- zu Faserdurchmesser (Axon + Myelin) (FOSTER et al., 1980; THOMAS et al., 1997). Da hier nur myelinisierte Axone in die Auswertung einbezogen wurden, erlauben diese Werte eine Beurteilung der Remyelinisierung. Während sich die G-ratio bei Kontrolltieren, ausgehend vom Wert 0,93 zum Zeitpunkt des Absetzens von Cuprizon, in den folgenden 6 Wochen auf 0,82 verringerte, zeigten Tiere nach 6-wöchiger Sst-Behandlung mit einer G-ratio von 0,90 eine kaum stattgehabte Remyelinisierung. Die G-ratio der für 6 Wochen mit Sst behandelten Tiere war gegenüber der einer 3-wöchigen Sst-Applikation nur unwesentlich verringert, hingegen zeigten Tiere ohne Sst eine deutlich dickere Wiederbemerkung. Eine fortschreitende Remyelinisierung war demzufolge innerhalb der letzten 3

Behandlungswochen kaum erkennbar, die Dicke von Myelin änderte sich praktisch nicht mehr. Unterschiede zwischen den Sst-Konzentrationen waren nicht feststellbar. Ausgehend davon, dass die Dicke einer Myelinlamelle  $\sim 120\text{-}140 \text{ \AA}$  beträgt, ließ sich via Dicke der Myelinschicht die Anzahl umwickelnder Lamellen abschätzen. „Age-matched“-Kontrollen wiesen  $\sim 5\text{-}6$  Lamellen pro Axon auf, nach Behandlung mit Cuprizone sank der Wert auf  $\sim 1\text{-}2$ . Während Axone der Kontrolltiere 6 Wochen nach Absetzen der Diät wieder von  $\sim 4\text{-}5$  Lamellen umwickelt waren, zeigten Sst-behandelte Tiere zu diesem Zeitpunkt nur  $\sim 2\text{-}3$  Myelinlamellen pro Axon.

Eine von PAINTLIA et al. (2005) dargestellte Verbesserung der Remyelinisierung bei Lewis-Ratten nach Behandlung mit 2 mg Lovastatin/kg b.wt. (i.p.) im EAE-Modell wurde durch Förderung des Überlebens und der Differenzierung von OL-Vorläuferzellen begründet. Als Kriterium für eine verbesserte Remyelinisierung galt der Gehalt an Cerebrosiden, Sulfatiden und Sphingomyelin. Bezüglich der Lovastatin-Konzentration ist anzumerken, dass DIOMEDE et al. (2001) in einem Entzündungsmodell der Haut erst ab einer Konzentration von 5 mg Lovastatin/kg b.wt. eine signifikante Hemmung der HMG-CoA Reduktase messen konnten. Eine Förderung des Überlebens und der Differenzierung von OL durch Sst war im Cuprizone-Modell nicht nachweisbar. Dass dieser Befund mit einer in vitro stattgefundenen Stimulation von RhoA-Signalkaskaden korreliert, wurde bereits von MI et al. (2005) berichtet; eine Aktivierung von RhoA ging bei OL in vitro sogar mit einer Hemmung der Differenzierung und bei der Maus in vivo mit einer Störung der Myelinisierung einher. Die über NogoA detektierte OL-Zahl war infolge einer Sst-Behandlung nicht wesentlich verändert. Dies impliziert, dass allein die zur Remyelinisierung führenden Mechanismen gehemmt waren.

Wie HIREMATH et al. (1998) beschrieben, fand während der Behandlung mit Cuprizone eine Aktivierung von Mikrogliazellen statt, die infolge des Absetzens von Cuprizone wieder zurückging. Über eine von KUIPERS et al. (2006) beschriebene Verhinderung der Aktivierung und Migration von Mikrogliazellen kann hier keine Aussage gemacht werden, da nach Absetzen von Cuprizone keine weitere Aktivierung erfolgte und die Zahl bei Kontrollen und Sst-behandelten Tieren gleichmäßig zurückging.

Eine infolge von Cuprizone aufgetretene geringe Zahl geschädigter Axone ließ sich nur über APP-Färbung nachweisen (MERKLER et al., 2005) und ging nach Absetzen der Diät in Kontrollen und Sst-behandelten Tieren gleichmäßig zurück. Bereits SÄTTLER

et al. (2005) hatten bei einer MOG-induzierten optischen Neuritis gezeigt, dass die Applikation von Sst keinen positiven Einfluss auf geschädigte Axone hat.

#### **6.4 Demyelinisierung unter Cuprizon sowie Remyelinisierung unter Sst – Myelinproteine**

Klare Effekte einer Demyelinisierung durch Cuprizon sowie einer durch Sst induzierten Hemmung der Remyelinisierung zeigte die im Western Blot dargestellte Expression von Myelinproteinen. Dass eine durch Behandlung mit Cuprizon mediierte Demyelinisierung mit einer Reduktion von Myelinproteinen einhergeht, zeigten bereits JUREVICS et al. (2002) am Beispiel von MBP.

Ausgehend von den nach Cuprizon verringert nachweisbaren Myelinproteinen MBP, PLP und CNP stieg deren Expression in Kontrolltieren nach Absetzen der Diät wieder an. Im Gegensatz dazu war, einhergehend mit der elektronenmikroskopischen Auswertung, die Expression unter Sst deutlich vermindert, ein wesentlicher Unterschied zwischen 10 mg Sst/kg b.wt. sowie 50 mg Sst/kg b.wt. war nicht sichtbar. Auffällig war dabei, dass gerade CNP, das in vitro den geringsten Anteil einer verminderten Neusynthese unter Sst ausmachte, in vivo hinsichtlich der Expression am stärksten betroffen war. Eine mögliche Ursache dafür wurde schon von DeANGELIS und BRAUN (1996) beschrieben und liegt darin begründet, dass CNP posttranslational modifiziert wird, was für eine Membranassoziation und den Einbau in Myelin notwendig ist. Auch bei Ratten wurde in vivo ein verminderter Einbau von CNP durch Behandlung mit Lovastatin nachgewiesen und auf eine fehlende Prenylierung des Myelinproteins zurückgeführt (SEPP-LORENZINO et al., 1994). Von einem verminderten Einbau waren auch unprenylierte Myelinproteine wie z.B. PLP und MBP betroffen, deren Transport zur Myelinmembran und dortiger Einbau vesikulär ablaufen (CULLEN und WEBSTER, 1977; BRAUN et al., 1980; COLMAN et al., 1982). An einer Regulation vesikulärer Transportprozesse sind kleine G-Proteine beteiligt (HALL, 1990). Eine durch Sst hervorgerufene fehlende Prenylierung und beeinträchtigte Funktion von p21Ras und RhoG (sowie Rab-Proteinen) könnten somit den vesikulären Transport stören und für einen verminderten Einbau von PLP oder MBP in Myelin verantwortlich sein (SEPP-LORENZINO et al., 1994).

Durch die in vivo Daten kann eindeutig belegt werden, dass Sst innerhalb der untersuchten Behandlungszeit zu einer deutlichen Hemmung der Remyelinisierung

führt, und die zugrunde liegenden Mechanismen auf einer Störung der zur Remyelinisierung führenden Prozesse in OL beruhen.

## 7. Einsatz von Simvastatin bei MS

Bisher gibt es zwei kleine klinische Studien, in der Statine (Sst und Lovastatin) zur Behandlung einer MS eingesetzt wurden. VOLLMER et al. (2004) untersuchten bei 30 Patienten mit chronisch fortschreitender MS den Einfluss einer täglichen Dosis von 80 mg Sst auf die Entstehung neuer Gadolinium-angereicherter Läsionen (GdL). Eine Behandlung mit Sst konnte die Anzahl neu entstehender GdL vermindern. Die mit Sst zu behandelnden Patienten dieser Studie wurden allerdings aufgrund der im MRT-Scan erscheinenden GdL ausgewählt, die synonym für neue Läsionen und damit einen aktiven Krankheitsverlauf sind. Als Vergleich dienten Patienten mit einer chronisch fortschreitenden MS ohne GdL, eine Placebogruppe fehlte. Wie auch von POLMAN und KILLESTEIN (2004) kritisiert, folgt in Patienten nach Entstehung einer Läsion auch ohne zusätzliche Behandlung wieder eine Reduktion des aktiven Krankheitsverlaufes, der natürlich Patienten der Kontrollgruppe, die im weiteren Verlauf neue GdL entwickeln, gegenüberstehen. Die Entwicklung neuer GdL als Maß einer Reduktion des Krankheitsverlaufes unter Sst anzusehen ist daher fraglich. Zudem wurde unter der angegebenen Dosis keine Veränderung der Expression von immunologischen Markern wie Oberflächenmolekülen auf Leukozyten oder Zytokinen im Gehirn gefunden, Effekte, die unter dem Einfluss von Sst verändert sein sollten. Von einer unveränderten Expression der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 berichteten auch ERIKSTRUP et al. (2006) nach 14-tägiger Applikation von 20 mg Sst. Es stellt sich damit die Frage, ob die von VOLLMER et al. (2004) verwendete tägliche Dosierung von 80 mg ausreichend ist um die gewünschten antiinflammatorischen Statineffekte im Gehirn zu erzielen. Bei Anwendung höherer Dosen Sst wurde von SCHULZ et al. (2004) angemerkt, dass dies mit einer Störung neuronaler Reparaturmechanismen einhergehen könnte. Auch auftretende Nebenwirkungen, von denen toxische Myopathien zu den schwerwiegendsten zählen, müssen bei der Anwendung hoher Dosen bedacht werden. Andererseits muss eine Sst-Applikation nicht zwingend mit einer antiinflammatorischen Wirkung verbunden sein: So berichteten KIENER et al. (2001) von einem Anstieg der Produktion von Zytokinen wie IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bei humanen Monozyten unter 5  $\mu$ M Sst. Eine Hochregulation inflammatorischer

Moleküle kann über ROCK erfolgen (TAWARA und SHIMOKAWA, 2007). Dass eine Hemmung der Synthese von Isoprenoiden proinflammatorische Wirkungen nach sich ziehen kann, kommt bei der Mevalonatazidurie zum Ausdruck. Bei dieser Krankheit treten infolge eines Defekts der Mevalonatkinase via fehlender Isoprenoid-Synthese systemische Entzündungen auf, die u.a. durch periodische Fieberattacken gekennzeichnet sind (HOUTEN et al., 2003).

Gegenüber VOLLMER et al. (2004) untersuchten SENA et al. (2003) bereits zuvor in einer kleinen Studie die Wirkung einer täglichen Dosis von 40 mg Lovastatin auf die Entstehung neuer GdL bei 7 Patienten mit chronisch fortschreitender MS. Zunächst war auch ein Rückgang neuer GdL zu verzeichnen; ein Jahr nach Beginn der Therapie entwickelten jedoch 5 der 7 Patienten neue Läsionen (SENA et al., 2004). Daher lassen Ergebnisse einer von VOLLMER et al. (2004) durchgeführten Studie mit Sst für 6 Monate keine Aussage über einen inhibitorischen Effekt auf die Progression der MS zu. In diesen Studien wurde der Aspekt einer Remyelinisierung außer Acht gelassen, doch gerade diese ist für eine Restitution des axonalen Erregungsablaufs und die Reduktion sich sekundär einstellender axonaler Schädigung bedeutend und sollte bei einer MS-Therapie bedacht werden (LASSMANN et al., 1997).

Die durch Sst in vitro bei OL hervorgerufene Fortsatzretraktion, der eintretende Zelltod und eine reduzierte Myelinproteinsynthese wurden durch in vivo Daten, die eine durch Sst hervorgerufene Hemmung der Remyelinisierung und Myelinproteinsynthese zeigten, komplementiert und implizieren einen negativen Effekt hinsichtlich einer Remyelinisierung bei MS. Für eine hypothetische Übertragung dieser Daten auf humane OL ist hinsichtlich der in vitro und in vivo eingesetzten Konzentrationen, die für eine Immunmodulation beim Mensch verwendete Dosierungen einschließen, die speziesabhängige Sensibilität von OL für Sst zu bedenken. MIRON et al. (2007) beschrieben, dass Ratten-OL ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Sst eine Fortsatzretraktion zeigten, während bei humanen OL dies bereits ab 100 nM Sst zu beobachten war.

Da sich anhand des von uns gewählten Behandlungszeitraums in vivo, der maximal 6 Wochen betrug, keine Aussage über eine Remyelinisierung nach langfristiger Einnahme von Sst machen lässt, bleibt die Frage offen, ob die Remyelinisierung zwar zunächst verzögert, aber dennoch bei längerer Therapie vollständig ablaufen kann. Vergleiche der Behandlungen für 3 und 6 Wochen zeigten, dass zwar eine Remyelinisierung stattfindet, die allerdings im weiteren Verlauf der Behandlung (6 Wochen) noch stärker gehemmt

zu sein scheint als kurz nach Beginn der Therapie. Im Vergleich dazu zeigten Kontrolltiere, dass 6 Wochen nach Maximum der Demyelinisierung wieder eine nahezu vollständige Remyelinisierung stattgefunden hat. Würde man vom Ablauf der Remyelinisierung unter Sst im Cuprizin-Modell auf die Wiederbemarkung demyelinisierter Areale des Menschen extrapolieren, ergäbe sich ein klarer negativer Effekt.

## **8. Weitere Aspekte zum Einsatz von Simvastatin**

In der vorliegenden Arbeit konnten einige Aspekte beleuchtet werden, die mit einer Wirkung von Sst auf OL und Remyelinisierung verbunden sind. Aus deren Untersuchungen haben sich weitere Fragen ergeben, wie z.B. über welchen Weg ROCK eine Fortsatzretraktion vermittelt und wie eine Hemmung von ROCK zur verstärkten Fortsatzverzweigung führt, welchen Einfluss Rac-GTP und Cdc42-GTP auf Effektoren des Zytoskeletts haben, ob RhoG bei der Entwicklung von OL essentiell ist und welche Regulationsmechanismen zwischen den kleinen G-Proteinen bestehen. In dieser Arbeit konnte nur ein begrenztes Spektrum kleiner GTPasen untersucht werden; zum genauen Verständnis der durch Sst beeinflussten Signalwege von OL muss die Beteiligung weiterer kleiner G-Proteine in Betracht gezogen werden, so z.B. Rab-Proteine, die am vesikulären Transport beteiligt sind (TAKAI et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Rab-Proteine während der Differenzierung von OL angereichert und beim Transport von Proteinen zu Myelin beteiligt sind (RODRIGUEZ-GABIN et al., 2001; RODRIGUEZ-GABIN et al., 2004). Über Prenylierung mit GGPP werden der Transport von Rab-Proteinen zur Zielmembran sowie deren dortige Verankerung ermöglicht (CHAVRIER et al., 1991). Eine Beeinträchtigung der Funktion von Rab unter Sst wäre denkbar.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit galt der Aufklärung von Folgeerscheinungen eines FPP und GGPP Defizits. Zwar bestünde innerhalb einer eventuellen MS-Therapie unter Sst die Möglichkeit, durch Zugabe von Mevalonat diesem Defizit und damit einer verminderten Remyelinisierung entgegenzutreten; das hätte allerdings zur Folge, dass das primäre Ziel, Antiinflammation / Immunmodulation, nicht erreicht würde, da diese über Hemmung kleiner GTPasen mediiert wird.

Unter Sst werden aber auch weitere Stoffe des HMG-CoA Reduktase-Weges wie z.B. Ubichinon oder Dolichol nicht mehr synthetisiert.



Ubichinon (Coenzym Q) enthält eine Isoprenoid-Seitenkette, über die eine Membranverankerung erfolgt; für den Energiemetabolismus in Mitochondrien ist es essentiell. Eine Erhöhung der Ubichinon-Konzentration im Hirn ging im Mausmodell der amyotrophen Lateralsklerose mit einem neuroprotektiven Effekt einher (MATTHEWS et al., 1998). Die Hemmung der Synthese von Ubichinon via Sst würde diesem neuroprotektiven Effekt entgegenstehen. Inwieweit eine derartige Störung des Energiemetabolismus auftritt und eventuell zum oligodendroglialen Zelltod beiträgt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Dolichol fungiert in seiner aktivierten Form als Oligosaccharid-Carrier für die Glykosylierung von Proteinen; diese Modifizierung ist u.a. für die Membraninserierung von z.B. Kanalproteinen oder Rezeptoren von Wachstumsfaktoren notwendig (LARSSON, 1996; SCHENK et al., 2001). Sst-Nebenwirkungen wie Schlafstörung und Depression werden u.a. auf eine reduzierte Synthese von Dolichol zurückgeführt. SIDDALS et al. (2004) zeigten, dass es infolge einer Statinbehandlung zur Hemmung des IGF- („Insulin-like Growth Factor“) Signalweges kam. Da auch TrkA für eine Membraninserierung glykosyliert wird (WATSON et al., 1999), ergibt sich eine weitere potentielle Ursache für eine Störung der p21Ras-MAPK-Signalkaskade und die Unwirksamkeit von NGF unter Sst.

## V Zusammenfassung

Sst wurde aufgrund seiner antiinflammatorisch / immunmodulatorischen Wirkungen als mögliches Therapeutikum für die MS in Erwägung gezogen. Wesentlich dabei ist eine Hemmung der HMG-CoA Reduktase, die zu einer Reduzierung von Mevalonat sowie den Folgeprodukten FPP und GGPP führt. Da die für einen Remyelinisierungsprozess entscheidenden Signalwege über kleine G-Proteine laufen, für deren Funktion eine Prenylierung mit FPP und GGPP wichtig ist, wurde untersucht, welchen Einfluss Sst auf die Fortsatzbildung von kultivierten Schweine-OL *in vitro* und auf die Remyelinisierung bei C57BL/6N Mäusen *in vivo* hat.

*In vitro* führte die Behandlung mit Sst zu einer oligodendroglialen Fortsatzretraktion, die Zellen kugelten sich ab und begannen, sich von der Kulturschale abzulösen. Nach 72 h waren ca. 15 % der OL apoptotisch, wobei es zur Aktivierung von Caspase-3 und SAPK/JNK kam. Für die Aktivierung von SAPK/JNK ist eine Beteiligung von ROCK sowie Cdc42 und Rac1 denkbar. Morphologische Veränderungen konnten größtenteils auf eine verminderte Synthese der Intermediate GGPP und FPP zurückgeführt werden, die für eine Prenylierung kleiner G-Proteine notwendig sind. Eine Störung der Membranassoziation durch fehlendes FPP und GGPP wurde für p21Ras, RhoA und RhoG nachgewiesen. Durch Zugabe von Mevalonat und GGPP konnte der Fortsatzretraktion entgegengewirkt werden; eine unter Sst reduzierte Membranassoziation von p21Ras und, exemplarisch für Rho-Proteine, RhoA war nach Zugabe von Mevalonat nicht mehr nachweisbar. Zusätzlich gelang es erstmals über Transfektion zu zeigen, dass auch FPP in der Lage war, die reduzierte p21Ras Membranassoziation zu korrigieren.

Über Reduktion der Konzentration an p21Ras-GTP via fehlender Prenylierung kam es unter Sst zu einer Hemmung des p21Ras-MAPK-Signalweges, was sich in einer verminderten Aktivierung von ERK1/2 bemerkbar machte. Eine Hemmung der Aktivität von ERK1/2 ging neben der Fortsatzretraktion mit einer verminderten Synthese von Myelinproteinen einher.

Eine Störung der Aktivierung von Signalkaskaden konnte auch für RhoG beobachtet werden. Da für RhoG bisher kein Aktivitätsassay erhältlich ist, wurde eine Methode für den Nachweis der aktivierten, GTP-gekoppelten Form entwickelt. Eine in Kontroll-OL nachweisbare Interaktion mit einem Effektor, Elmo2, fand unter Sst nicht statt. Da RhoG für den Transport von MBP-mRNA zur Myelinmembran von Bedeutung ist,

könnte eine gestörte Funktion den Myelinisierungsprozess beeinträchtigen. Dass RhoG für das Fortsatzwachstum zwingend notwendig ist, war bei den hier verwendeten differenzierten OL nicht feststellbar; mit RhoG-siRNA transfizierte OL waren morphologisch nicht von Kontrollen unterscheidbar.

Im Gegensatz dazu war eine unerwartete Zunahme von RhoA-GTP, Rac1-GTP sowie Cdc42-GTP infolge der Sst-Applikation zu registrieren. Mehrere Faktoren könnten dabei eine Rolle spielen: Bei fehlender Prenylierung kommt es zwar nicht zu einer ansonsten benötigten Membranassoziation aber auch nicht zu einer Interaktion mit Negativregulatoren wie GDIs. Bei normalerweise vorhandenem GTP-Überschuss (OLOFSSON, 1999) könnte ein Austausch zu GTP spontan oder durch zytosolische GEFs erfolgen; daneben ist eine fehlende Interaktion mit membrangebundenen GAPs, die ebenfalls eine Prenylierung dieser Proteine benötigen, denkbar.

Über RhoA fand in OL unter Sst eine Aktivierung von ROCK statt; allerdings war keine ROCK-vermittelte MLC-Aktivierung über Phosphorylierung nachweisbar. Eine Hemmung von ROCK führte zur vermehrten Fortsatzbildung, was eventuell therapeutisch genutzt werden könnte.

Durch Rac1 gebildete „Mikrospikes“ waren nach Zugabe von Sst nicht mehr erkennbar; welche Auswirkungen die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 auf Strukturen des Zytoskeletts haben, muss noch näher untersucht werden.

Für in vivo Untersuchungen, die an C57BL/6N Mäusen geplant waren, galt es sicherzustellen, dass Befunde an Schweine-OL auf Mäuse übertragbar sind. Dazu wurde die Wirkung von Sst auf primäre OL des oben genannten Stammes untersucht. Eine Fortsatzretraktion, Abnahme des oligodendroglialen Cholesterinspiegels sowie die Reduktion der ERK1/2-Aktivität waren auch hier unter Sst zu verzeichnen.

Die in vitro Befunde implizierten einen negativen Sst-Effekt auf die Myelinsynthese durch OL. Eine damit verbundene Relevanz auf die Remyelinisierung in vivo wurde an Mäusen, die eine durch Cuprizone hervorgerufene Demyelinisierung hauptsächlich im Bereich des Corpus callosum aufwiesen, analysiert. Nach Absetzen von Cuprizone waren ~ 66 % der Axone demyelinisiert. Unter 1, 10 und 50 mg Sst/kg b.wt. verzögerte sich im Vergleich zu Kontrollen die Remyelinisierung deutlich. Während Kontrolltiere 6 Wochen nach Absetzen von Cuprizone hinsichtlich einer Myelinisierung fast Kontrollniveau erreichten (89 % myelinisierte Axone), waren unter Sst nur maximal 58 % der Axone myelinisiert. Zusätzlich zeigte die G-Ratio, bei der bemerkte Axone ausgewertet wurden, eine unter Sst verminderte Dicke der Myelinschicht, d.h. weniger

Lamellen. Dass die Zahl an OL unter Sst unverändert war, implizierte eine Hemmung der zur Remyelinisierung führenden Signalwege. Biochemisch war eine Reduktion der exprimierten Myelinproteine MBP, PLP und CNP nachweisbar.

Da das Maximum der Statintherapie in dieser Arbeit bei 6 Wochen lag, bleibt offen, ob es bei dem Cuprizone-Modell unter Sst nicht nur zu einer verzögerten, sondern auch zu einer unvollständigen Remyelinisierung kommt.

Die Strategie einer MS-Therapie sollte sowohl eine Reduktion der Entzündungsprozesse sowie eine Förderung der Remyelinisierung beinhalten. Auf jeden Fall sollte eine eingeschlagene antiinflammatorische Therapie nicht einem Remyelinisierungsprozess entgegenstehen und eventuell zu einer Verlaufsverschlechterung (s. TNF- $\alpha$  Therapie) führen. Zu bedenken ist weiterhin, dass es sich bei der MS nicht wie bei Cuprizone um ein singuläres Ereignis handelt, sondern Demyelinisierungsherde in Schüben auftreten.

In Anbetracht der *in vitro* und *in vivo* aufgezeigten Daten, die eine Hemmung der Remyelinisierungsprozesse unter therapeutischen Sst-Konzentrationen aufzeigten, erscheint zunächst ein Langzeit-Einsatz von Sst bei der MS nicht empfehlenswert.

## VI Literaturverzeichnis

**Agranoff B.W., Hajra A.K. (1994):** Properties of Brain Lipids. In: Basic Neurochemistry, 5<sup>th</sup> Edition, edited by Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. New York: Raven, 117-143

**Alessi D.R., James S.R., Downes C.P., Holmes A.B., Gaffney P.R.J. Reese C.B., Cohen P. (1997):** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B  $\alpha$ . *Curr Biol* 7: 261-269

**Althaus H.H., Montz H., Neuhoff V., Schwartz P. (1984):** Isolation and cultivation of mature oligodendroglial cells. *Naturwissenschaften* 71: 309-315

**Althaus H.H., Schröter J., Spoerri P., Schwartz P., Klöppner S., Rohmann A., Neuhoff V. (1991):** Protein Kinase C stimulation enhances the process formation of adult oligodendrocytes and induces proliferation. *J Neurosci Res* 29: 481-489

**Althaus H.H., Klöppner S., Schmidt-Schulz T., Schwartz P. (1992):** Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. *Neurosci Lett* 135: 219-223

**Althaus H.H., Hempel R., Klöppner S., Engel J., Schmidt-Schulz T. Kruska L., Heumann R. (1997):** Nerve growth factor signal transduction in mature pig oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 50: 729-742

**Althaus H.H., Richter-Landsberg C. (2000):** Glial Cells as Targets and Producers of Neurotrophins. *Intl Rev Cytol* 197: 203-277

**Althaus H.H. (2004):** Remyelination in multiple sclerosis: a new role for neurotrophins? *Prog Brain Res* 146: 415-432

---

**Amano M., Chihara K., Nakamura N., Fukata Y., Yano T., Shibata M., Ikebe M., Kaibuchi K. (1998):** Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes to Cell* 3: 177-188

**Amor S., Groome N., Linington C., Morris M.M., Dornmair K., Gardinier M.V. (1994):** Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol* 153: 4349-56

**Asakura K., Rodriguez M. (1998):** A unique population of circulating autoantibodies promotes central nervous system remyelination. *Mult Scler* 4: 217-221

**Aspenström P. (1999):** Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 11:95-102

**Baigent C., Keech A., Kearney P.M., Blackwell L., Buck G., Pollicino C., Kirby A., Sourjiana T., Peto R., Collins R., Simes R., Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators (2005):** Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366: 1267-1278

**Barry C., Pearson C., Barbarese E. (1996):** Morphological organization of oligodendrocyte processes during development in culture and *in vivo*. *Dev Neurosci* 18: 233-242

**Bar-Sagi D., Hall A. (2000):** Ras and Rho GTPases: A Family Reunion. *Cell* 103: 227-238

**Bar-Sagi D. (2001):** MINIREVIEW – A Ras by Any Other Name. *Mol Cell Biol* 21(5): 1441-1443

**Baumann N., Pham-Dinh D. (2001):** Biology of oligodendrocytes and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81: 871-927

---

**Berridge M.J. (1987):** Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56: 159-193

**Berridge M.J. (1993):** Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 361: 315-325

**Bhat N.R., Hauser K.F., Kindy M.S. (1992):** Cell proliferation and protooncogene induction in oligodendroglial progenitors. *J Neurosci Res* 32: 340-349

**Bhat N.R., Zhang P. (1996):** Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Oligodendrocytes. *J Neurochem* 66: 1986-1994

**Bishop A.L., Hall A. (2000):** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 348: 241-255

**Bjartmar, C.; Hildebrand, C. und Loinder, K. (1994):** Morphological heterogeneity of rat oligodendrocytes: electron microscopic studies on serial sections. *Glia* 11: 235-44

**Björkholm, I., Meaney S. (2004):** Brain cholesterol: Long Life Behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 806-815

**Blanko-Colio, L.M., Villa A., Ortego M., Hernández-Presa M.A., Pascual A., Plaza J.J., Egido J. (2002):** 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and RhoA prenylation. *Atheroscl* 161: 17-26

**Blakemore W.F. (1973):** Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by Cuprizone. *J Neurol. Sci* 20: 63-72

**Blakemore W.F. (1974):** Pattern of remyelination in the CNS. *Nature* 249: 577-578

**Boison D., Bussow H., D'Urso D., Muller H.W., Stoffel W. (1995):** Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. *J Neurosci* 15: 5502-5513

**Boivin D., Bilodeau D., Béliveau R. (1996) :** Regulation of cytoskeletal functions by Rho small GTP-binding proteins in normal and cancer cells. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 801-810

**Boucher K., Siegel C.S., Sharma P., Hauschka P.V., Solomon K.R. (2006):** HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in pericytes. *Microvasc Res* 71(2): 91-102

**Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. (1991):** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127

**Bösel J., Endres M. (2005):** Direkte neuronale Effekte von Statinen. *Nervenarzt* 77: 289-293

**Bradford M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

**Braun P.E., Pereyra P.M., Greenfield S. (1980):** Myelin organization and development: a biochemical perspective. *Prog Clin Biol Res* 49: 1-17

**Braun P.E., Sandillon F., Edwards A., Matthieu J.M., Privat A. (1988):** Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *J Neurosci* 1988, 3057-3066

**Braun P.E., De Angelis D., Shtybel W.W., Bernier L. (1991):** Isoprenoid modification permits 2'3'-cyclic nucleotide-3'phosphodiesterase to bind to membranes. *J Neurosci Res* 30: 540-544

**Bray D., Chapman K. (1985):** Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J Neurosci* 5: 3204-3213

**Brazil D.P., Yang Z.Z., Hemmings B.A. (2004):** Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 29(5): 233-242



- 
- Bredel M., Pollak I.F. (1999):** The p21-*Ras* signal transduction pathway and growth regulation in human high-grade gliomas. *Brain Res Rev* 29: 232-249
- Brunet N., Morin A., Olofsson B. (2003):** RhoGDI-3 Regulates RhoG and Targets this Protein to the Golgi Complex Through its Unique N-Terminal Domain. *Traffic* 3(5): 342-358
- Brunner C., Lassmann H., Waehneltd T.V., Matthieu J.M., Linington C. (1989):** Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin-oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52: 296-304
- Brück W., Schmied M., Suchanek G., Brück Y., Breitschopf H., Poser S., Piddleseden S, Lassmann H. (1994):** Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 35: 65-73
- Brück, W., Kuhlmann T., Stadelmann C. (2003):** Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206: 181-185
- Brüstle O., Jones K.N., Learish R.D., Karram K., Choudhary K., Wiestler O.D. et al. (1999):** Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285: 754-756
- Buddeberg B.S., Kerschensteiner M., Merkler D., Stadelmann C., Schwab M.E. (2004):** Behavioral testing strategies in a localized animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 153: 158-170
- Budzyn K., Marley P.D., Sobey C.G. (2006):** Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 27(2): 97-104
- Bunge M.B., Bunge R.P., Ris H. (1961):** Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in the adult cat spinal cord. *J Biophys Biochem Cytol* 10: 67-94

---

**Bunge M.B., Bunge R.P., Pappas G.D. (1962):** Electron microscopic demonstration of the connections between glia and myelin sheath in the developing mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 12: 448–459

**Bunge R.P. (1968):** Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev* 197-251

**Bürgisser P., Althaus H.H., Rohmann A., Neuhoff V. (1988):** Lipid synthesis by oligodendrocytes from adult pig brain maintained in long-term culture. *Neurochem Int* 13: 111-118

**Burnette W.N. (1981):** “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203

**Buschmann T., Martin-Villalba A., Kocsis J.D., Waxman S.G., Zimmermann M., Herdegen T. (1998):** Expression of Jun, Fos and ATF-2 Proteins in axotomized explanted and cultured adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci* 84(1): 163-176

**Butt, A.M. und Ransom, B.R. (1989):** Visualisation of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of Lucifer yellow and horseradish peroxidase. *Glia* 2: 470-475

**Campagnoni A.T., Macklin W.B. (1988):** Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Mol Neurobiol* 2: 41-89

**Carlucci G., Mazzeo P., Biordi L., Bologna M. (1992):** Simultaneous determination of simvastatin and its hydroxy acid form in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Pharmac Biomed Anal* 10 (9): 693-697

**Carson J.H., Worboys K., Ainger K., Barbarese E. (1997):** Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil Cytoskeleton* 38(4): 318-328

---

**Casey P.J., Solski P.A., Der, C.J., Buss J.E. (1989):** p21Ras is modified by a farnesyl isoprenoid. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8323-8327

**Casey P. J. (1995):** Protein lipidation in cell signaling. Science 268: 221-224

**Chakrabarti, R., Engleman E.G. (1991):** Interrelationship between mevalonate metabolism and the mitogenic signaling pathway in T Lymphocyte proliferation. J Biol Chem 266: 12216-12222

**Charcot, J.M. (1868) :** Histologie de la sclérose en plaques. Gaz Hôp, 41; 554-555, 557-558, 566.

**Chavrier P., Gorvel J.P., Stelzer E., Simons K., Gruenberg J., Zerial M. (1991):** Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. Nature 353: 769-772.

**Chen M.S., Huber A.B., van der Haar M.E., Frank M., Schnell L., Spillmann A.A., Christ F., Schwab M.E. (2000):** Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. Nature 403(6768): 434-439

**Chen Z., Fukutomi T., Zago A.C., Ehlers R., Detmers P.A., Wright S.D., Rogers C., Simon D.I. (2002):** Simvastatin Reduces Neointimal Thickening in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice After Experimental Angioplasty Without Changing Plasma Lipids. Circ 106: 20-23

**Cheng G., Shan J., Xu G., Huang J., Ma J., Ying S., Zhu L. (2003) :** Apoptosis induced by simvastatin in rat vascular smooth muscle cell through Ca<sup>2+</sup>-calpain and caspase-3 dependent pathway. Pharmacol Res 48(6): 571-578

**Choi J.W., Jung S.E. (1999):** Lovastatin-Induced Proliferation Inhibition and Apoptosis in C6 Glial Cells. J Pharmacol Exp Therap 289(1): 572-579

**Chuang T.H., Bohl B.P., Bokoch G.M. (1993):** Biologically active lipids are regulators of Rac/GDI complexation. J Biol Chem 268: 26206-26211

---

**Colman D.R., Kreibich G., Frey A.B., Sabatini D.D. (1982):** Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* 95: 598-608

**Comi, G., Fillipi, M., Wolinsky, J.S. (2001):** European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebocontrolled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Annals of Neurology* 49, 290-297.

**Compston A., Coles A. (2002):** Multiple sclerosis. *Lancet* 359 : 1221-1231

**Cool C., Wood K., Tuder R.H., Burns N., Kasper M., Voelkel N.F. (2006):** Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L668-676

**Copray J.C.V.M., Küst B.M., Mantingh-Otter I., Boddeke H.W.G.M. (2005):** p75<sup>NTR</sup> independent oligodendrocyte death in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Neuropath Appl Neurobiol* 31: 600-609

**Cordle A., Koenigsknecht-Talboo J., Wilkinson B., Limpert A., Landreth G. (2005):** Mechanism of Statin-mediated Inhibition of Small G-protein Function. *J Biol Chem* 280 (40): 34202-34209

**Corsini A., Bellosta S., Baetta R., Fumagalli R., Paoletti R., Bernini F. (1999):** New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Therapeut* 84: 413-428

**Coso O.A., Chiariello M., Yu J.C., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T., Gutkind J.S. (1995):** The small GTP-Binding Proteins Rac1 and Cdc42 Regulate the Activity of the JNK/SAPK Signaling Pathway. *Cell* 81(7): 1137-1146

**Crews C.M., Alessandrini A., Erikson R.L. (1992):** The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258: 478-480

---

**Cullen M.J., Webster H. de F. (1977):** The effect of low temperatures on myelin formation in optic nerves of *Xenopus* tadpoles. *Tissue Cell* 9: 1-10

**Cuthbert J.A., Lipsky, P.E. (1991):** A product of mevalonate proximal to isoprenoids is the source of both a necessary growth factor and an inhibitor of cell proliferation. *Trans Assoc Am Physicians* 104: 97-106

**Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. (1999):** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13(22): 2905-2927

**Dawson J., Hotchin N., Lax S., Rumsby M. (2003):** Lysophosphatidic acid induces process retraction in CG-4 line oligodendrocytes and oligodendrocyte precursor cells but not in differentiated oligodendrocytes. *J Neurochem* 87(4): 947-957

**DeAngelis D.A., Braun P.E. (1996):** Binding of 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase to Myelin: An In Vitro Study. *J Neurochem* 66: 2523-2531

**Deber, C.M. und Reynolds, S.J. (1991):** Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clin. Biochem.* 2: 113-34

**Deitmer J.W., Kreutzberg G. (2000):** Die Glia des Nervensystems – Funktion und Leistungen. *biologen heute* 3/2000

**Delcommenne M., Tan C., Gray V., Rue L., Woodgett J., Dedhar S. (1998):** Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/Akt by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci* 95: 11211-11216

**Denhardt D.T. (1996):** Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 318: 729-744

**Dérillard B., Hibi M., Wu I.H. Barrett T., Su B., Deng T., Karin M., Davis R.J. (1994):** JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76: 1025-1037

---

**Der Mardirossian C, Bokoch G.M. (2005):** GDIs: central regulatory molecules in Tho GTPase activation. *TRENDS in Cell Biology* Vol.15 No.7: 356-363

**Diaz-Zagoya J.C., Asenjo-Barrón J.C., Cárdenaz-Vázquez R., Martínez F., Juárez-Oropeza M.A. (1999):** Comparative toxicity of high doses of Vastatins currently used by clinicians, in CD-1 male mice fed with a hypercholesterolemic diet. *Life Sci* 65(9): 947-956

**Dietschy J.M., Turley S.D. (2004):** Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45(8): 1375-1397

**Diomedede L., Albani D., Sottocorno M., Donati M.B., Bianchi M., Fruscella P., Salmona M. (2001):** In Vivo Anti-Inflammatory Effect of Statins Is Mediated by Nonsterol Mevalonate Products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1327-1332

**Dyer C.A., Matthieu J.M. (1994) :** Antibodies to myelin/oligodendrocyte-specific protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein signal distinct changes in the organization of cultured oligodendroglial membrane sheets. *J Neurochem* 62: 777-787

**Eccleston P.A., Silberberg, D.H. (1984):** Fibroblast growth factor is a mitogen for oligodendrocytes in vitro. *Brain Res* 210: 315-318

**Egan S.E., Giddings B.W., Brooks M.W., Buday L., Sizeland A.M., Weinberg R.A. (1993):** Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363: 45-51

**Endo A., Kuroda M., Tsujita Y. (1976):** ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 29, 1346-1348

**Erikstrup C., Ullum H., Pedersen B.K. (2006):** Short-term simvastatin treatment has no effect on plasma cytokine response in a human *in vivo* model of low-grade inflammation. *Clin Exp Immunol* 144(1): 94-100

---

**Evans, M., Rees A. (2002):** Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same? *Drug Saf* 25(9): 649-663

**Fassbender K., Stroick M., Bertsch T., Ragoschke A., Kuehl S., Walter S., Walter J., Brechtel K., Muehlhauser F., Von Bergmann K., Lütjohann D. (2002):** Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurol* 59: 1257-1258

**Ferguson B., Matyszak M.K., Esiri M.M., Perry V.H. (1997):** Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120: 393-399

**Filbin M.T. (1996):** The muddle with MAG. *Mol Cell Neurosci* 8: 84-92

**Foster R.E., Kocsis J.D., Malenka R.C., Waxmann S.G. (1980):** Lysophosphatidylcholine-induced focal demyelination in the rabbit corpus callosum. *J Neurol Sci* 48: 221-231

**Frazier J.A., Field C.M. (1997):** Actin cytoskeleton: are FH proteins local organizers? *Curr Biol* 7(7): R414-R417

**Gale N.W., Kaplan S., Lowenstein E.J., Schlessinger J., Bar-Sagi D. (1993):** Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 363: 88-92, 1993

**Gard A.L., Pfeiffer S.E. (1990):** Two proliferative stages of the oligodendrocyte lineage (A2B5+O4- and O4+galC-) under different mitogenic control. *Neuron* 5: 615-625

**Gauthier-Rouvière C., Vignal E., Mériane M., Roux P., Montcourier P., Fort P. (1998):** RhoG GTPase Controls a Pathway That independently Activates Rac1 and Cdc42Hs. *Mol Biol Cell* 9: 1379-1394

**Gebicke-Härter P.J., Althaus H.H., Rittner I., Neuhoff V. (1984):** Bulk separation and long-term culture of oligodendrocytes from adult pig brain. 1. Morphological studies. *J Neurochem* 42: 357-368

**Gertz K., Laufs U., Lindauer U., Nickening G., Böhm M., Dirnagel U., Endres M. (2003):** Withdrawal of Statin Treatment Abrogates Stroke Protection in Mice. *Stroke* 34: 551-557

**Ghittoni R., Napolitani G., Benati D., Uliveri C., Patrussi L., Pasini F.L., Lanzavecchia A., Baldari C.T. (2006):** Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases. *Eur J Immunol* 36(11): 2885-2893

**Gold, R., Linigton C., Lassmann H. (2006):** Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129: 1953-1971

**Greenwood J., Steinman L., Zamvil S.S. (2006):** Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nature* 6: 358-370

**Griffith I.R., Montague P., Dickinson P. (1995):** The proteolipid protein gene. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 21(2): 85-96

**Gumienny T.L., Brugnera E., Tosello-Tramont A.C., Kinchen J.M., Haney L.B., Nishiwaki K., Walk S.F., Nemergut M.E., Macara I.G., Francis R., Schedl T., Qin Y., Van Aelst L., Hengartner M.O., Ravichandran K.S. (2001):** CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107(1): 27-41

**Gyetvai, A., Emri T., Takács K., Dergez T., Fekete A., Pesti M., Pócsi I., Lenkey B. (2006):** Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS Yeast Res* 6(8): 1140-1148



---

**Hall A. (1990):** The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Sci* 249: 635-640

**Hardy R. and Reynolds R. (1993):** Rat cerebral cortical neurons in primary culture release a mitogen specific for early (GD3+/O4-) oligodendroglial progenitors. *J Neurosci Res* 34: 589-600

**Harris M.B., Blackstone M.A., Sood S.G., Chunying L., Goolsby J.M., Venema V.J., Kemp B.E., Venema R.C. (2004):** Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H560-H566

**Hausding M., Witteck A., Rodriguez-Pascual F., Eichel-Streiber C., Förstermann U, Kleinert H. (2000):** Inhibition of small G proteins of the Rho family by statins or Clostridium difficile toxin B enhances cytokine-mediated induction of NO synthase II. *Br J Pharmacol* 131: 553-561

**He, Y, Grossmann, R.I., Udupa, J.K., Fulton, J., Constantinescu, C.S., Gonzales-Scrano, F., Babb, J.S., Mannon, L.J., Kolson, D.L., Cohen, J.A. (2000):** Glatiramer acetate (Copaxone) treatment in relapsing-remitting MS. Quantitative MR assessment. *Neurology*, 54; 813-817

**Hemmer B., Archelos J.J., Hartung H.P. (2002):** New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Rev Neurosci* 3: 291-302

**Hempel R. (1998):** Untersuchungen zur Nerve Growth Factor-induzierten Signalkaskade in Oligodendrozyten des Schweins (*Sus scrofa*). Dissertation

**Hempstead B.L., Salzer J.L. (2002):** A Glial Spin on Neurotrophins. *Science* 298: 1184-1186

**Hennwood J.M., Heel R.C. (1988):** Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties und therapeutic use in hyperlipidaemia. *Drugs* 36: 429-454

**Hess D.C., Demchuk A.M., Brass L.M., Yatsu F.M. (2000):** HMG-CoA reductase inhibitors (statins). A promising approach to stroke prevention. *Neurology* 54: 790-796

**Hiremath M.M., Saito Y., Knapp G.W., Ting J.P., Suzuki K., Matsushima G.K. (1998):** Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 92: 38-49

**Hirose M., Ishizaki T., Watanabe N., Uehata M., Kranenburg O., Moolenaar F., Maekawa M., Bito H., Narumiya S. (1998):** Molecular Dissection of the Rho-associated Protein Kinase (p160ROCK)-regulated Neurite Remodeling in Neuroblastoma N1E-115 Cells. *J Cell Biol* 141(7): 1625-1636

**Hohlfeld, R. (1999):** Therapeutic strategies in multiple sclerosis. I. Immunotherapy. *Philosophical Transactions of the royal society: Biological Sciences*, 1390; 1697-1710.

**Holly S.P., Larson M.K., Parise L.V. (2000):** MINIREVIEW Multiple Roles of Integrins in Cell Motility. *Exp Cell Res* 261: 69-74

**Holstein S.A., Wohlford-Lenane C.L., Hohl R.J. (2002):** Consequences of Mevalonate Depletion. *J Biol Chem* 277(12): 10678-10682

**Houten S.M., Frenkel J., Waterham H.R. (2003):** Isoprenoid biosynthesis in hereditary periodic fever syndromes and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 60: 1118-1134

**Hu K., Ji L., Applegate K.T., Danuser G., Waterman-Storer C.M. (2007):** Differential Transmission of Actin Motion Within Focal Adhesions. *Sci* 315: 111-115

**Huber A.B., Weinmann O., Brösamle C., Oertle T., Schwab M.E. (2002):** Patterns of Nogo mRNA and Protein Expression in the Developing and Adult Rat and After CNS Lesions. *J Neurosci* 22(9): 3553-3567

**Hynes R. (2002):** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 (6): 673-687

- 
- Iglesias A., Bauer J., Litzenburger T., Schubart A., Linington C. (2001):** T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 36: 220-234
- Ishikawa Y., Katoh H., Nakamura K., Mori K., Negishi M. (2002):** Developmental changes in expression of small GTPases RhoG mRNA in the rat brain. *Mol Brain Res* 106: 145-150
- Ishitsuka R., Sato S.B., Kobayashi T. (2005):** Imaging lipid rafts. *J Biochem* 137: 249-254
- Ishizaki T., Mackawa M., Fujisawa K., Okawa K., Iwamatsu A., Fujita A., Watanabe N., Saito Y., Kakisuka A., Morii N., Narumiya S. (1996):** The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 15: 1885-1893
- Istvan E., Deisenhofer J. (2001):** Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science* 292: 1160-1164
- Istvan E. (2003):** Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements* 4: 3-8
- Jackson J.H., Colchrane C.G., Bourne J.R., Solski P.A., Buss J.E., Channing D.J. (1990):** Farnesol modification of Kirsten-ras exon 4B protein is essential for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3042-3046
- Johnson-Anuna L.N., Eckert G.P., Keller J.H., Igbavboa U., Franke C., Fechner T., Schubert-Zsilavec M., Karas M., Müller W.E., Wood W.G. (2005):** Chronic Administration of Statins Alters Multiple Gene Expression Patterns in Mouse Cerebral Cortex. *J Pharmacol Exp Therapeut* 312(2): 786-793

**Jurevics H., Largent C., Hostettler J., Sammond D.W., Matsushima G.K., Kleindienst A., Toews A.D., Morell P. (2002):** Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *J Neurochem* 82: 126-136

**Jurewicz A., Matysiak M., Tybor K., Selmaj K. (2003):** TNF-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-3. *Brain* 126(6): 1358-1370

**Kameshita I., Fujisawa H. (1989):** A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal Biochem* 183: 139-143

**Kamholz J., Toffenetti J., Lazzarini R.A. (1988):** Organization and expression of the human myelin basic protein gene. *J Neurosci Res* 1: 62-70

**Kato T., Hashikabe H., Iwata C., Akimoto K., Hattori Y. (2004):** Statin blocks Rho/Rho-kinase signalling and disrupts the actin cytoskeleton: relationship to enhancement of LPS-mediated nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1689: 267-272

**Katoh H., Yasui H., Yamaguchi Y., Aoki J., Jujita H., Mori K., Negishi M. (2000):** Small GTPase RhoG Is a Key Regulator for Neurite Outgrowth in PC12 Cells. *Mol Cell Biol* 20(19): 7378-7387

**Katoh H., Negishi M. (2003):** RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* 424: 461-464

**Katoh K., Kano Y., Amano M., Onishi H., Kaibuchi K., Fujiwara K. (2001):** Rho-Kinase-mediated Contraction of Isolated Stress Fibers. *J Cell Biol* 153(3): 569-583

---

**Katznelson S., Wilkinson A.H., Kobashigawa J.A., Wang X.M., Chia D., Ozawa M., Zhong H.P., Hirata M., Cohen A.H., Teraski P.I. et al. (1996):** The effect of pravastatin on acute rejection after kidney transplantation – a pilot study. *Transplantation* 61: 1469-1474

**Kiener, P.A., Davis P.M., Murray J.L., Youssef S., Rankin B.M., Kowala M. (2001):** Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *Int Immunopharm* 1: 105-118

**Kirsch, C., Eckert G.P., Mueller W.E. (2003):** Statin effects on cholesterol microdomains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol* 65: 843-856

**Klugmann M., Schwab M.H., Pulhofer A., Schneider A., Zimmermann F., Griffiths I.R., Nave K.A. (1997):** Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18: 59-70

**Komoly S., Jeyasingham M.D., Pratt O.E., Lantos P.L. (1987):** Decrease in oligodendrocyte carbonic anhydrase activity preceding myelin degeneration in cuprizone induced demyelination. *J Neurol Sci* 78: 125-137

**Koyuturk M., Ersoz M., Altiok N. (2004):** Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. *Neurosci Lett* 370: 212-217

**Kozma R., Ahmed S., Best A., Lim I. (1995):** The ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15: 1942-1952

**Kuipers H.F., Rappert A.A.C., Mommaas A.M., Van Haastert E.S., Van der Valk, P., Boddeke H.W.G.M., Biber K.P.H., Van den Elsen P.J. (2006):** Simvastatin Affects Cell Motility and Actin Cytoskeleton Distribution of Microglia. *Glia* 53: 115-123

**Kumano T., Mutoh T., Nakagawa H., Kuriyama M. (2000):** HMG-CoA reductase inhibitor induces a transient activation of high affinity nerve growth factor receptor, Trk, and morphological differentiation with fatal outcome in PC12 cells. *Brain Res* 859: 169-172

**Kumar B., Andreatta C., Koustas W.T., Cole W.C., Edward-Prasad J., Prasad K.N. (2002):** Mevastatin induces degeneration and decreases viability of cAMP-induced differentiated neuroblastoma cells in culture by inhibiting proteasome activity, and mevalonic acid lactone prevents these effects. *J Neurosci Res* 68(5): 627-635

**Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I., Bialik A., Fulton D., Lefer D.J., Sessa W.C., Walsh K. (2000):** The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Med* 6(8): 1004-1010

**Kwintkiewicz J., Foyouzi N., Piotrowski P., Rzepczynska I., Duleba A.J. (2006):** Mevastatin inhibits proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells by blocking the mitogen-activated protein kinase pathway. *Fertility and Sterility* 86(3): 1053-1058

**Kyriakis J., Banerjee P., Nikolakaki E., Dai T., Ruble E., Ahmad M., Avruch J., Woodgett J. (1994):** The stress-activated protein kinase subfamily of c-JUN kinases. *Nature* 369: 156-160

**Langan T.J., Volpe J.J. (1987):** Oligodendroglial Differentiation in Glial Primary Cultures: Requirement for Mevalonate. *J Neurochem* 48(6): 1804-1808

**Larsson O. (1996):** HMG-CoA reductase inhibitors: role in normal and malignant cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 22: 197-212

**Lassmann H., Brück W., Lucchinetti C., Rodriguez M. (1997):** ReMyelination in Multiple Sclerosis. *Mult Scler* 3(2): 133-136

- Laufs U., Endres M., Custodis F., Gertz K., Nickenig G., Liao J.K., Böhm M. (2000):** Suppression of Endothelial Nitric Oxide Production After Withdrawal of Statin Treatment Is Mediated by Negative Feedback Regulation of Rho GTPase Gene Transcription. *Circ* 102(25): 3104-3110
- Lea A.P., Mc Travish D. (1997):** Atorvastatin. A review of its pharmacological and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. *Drugs* 53: 828-847
- Learish R.D., Brüstle O., Zhang S.-C., Duncan I.D. (1999):** Intraventricular transplantation of oligodendrocyte progenitors into a fetal myelin mutant results in widespread formation of myelin. *Ann Neurol* 46: 716-722
- Lebar R., Boutry J.M., Vincent C., Robineaux R., Voisin G.A. (1976):** Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. II. An in vitro investigation on the nature, properties, and specificity of the serum-demyelinating factor. *J Immunol* 116: 1439-1446
- Lebar R., Lubetzki C., Vincent C., Lombrail C., Boutry J.M. (1986):** The M2 antigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* 66: 423-443
- Leung T., Cheng X.Q., Manser E., Lim L. (1996):** The p160 RhoA-binding kinase ROK  $\alpha$  is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 16(10): 5313-5327
- Li, W., Cui Y., Kushner S.A., Brown R.A.M., Jentsch J.D., Frankland, P.W., Cannon T.D., Silva A.J. (2005):** The HMG-CoA Reductase Inhibitor Lovastatin Reverses the Learning and Attention Deficits in a Mouse Model of Neurofibromatosis Type 1. *Curr Biol* 15: 1961-1967
- Liang X., Draghi N.A., Resh M.D. (2004):** Signaling from Integrins to Fyn to Rho Family GTPases Regulates Morphologic Differentiation of Oligodendrocytes. *J Neurosci* 24(32): 7140-7149

- 
- Liao J.K. (2002):** Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest* 110: 285-288
- Liao J.K., Laufs U. (2005):** Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 89-118
- Liebetanz D., Merkler D. (2006):** Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 202(1): 217-224
- Linington C., Berger T., Perry L., Weerth S., Hinze-Selch D., Zhang Y. (1993):** T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* 23: 1364-1372
- Liu M., Horowitz A. (2006):** A PDZ-binding Motif as a critical Determinant of Rho Guanine Exchange Factor Function and Cell Phenotype. *Mol Biol Cell* 17: 1880-1887
- Lobell R. B., Omer C.A., Abrams M.T., Bhimnathwala H.G., Brucker M.J., Buser C.A., Davide J.P., DeSolms S.J., Dinsmore C.J., Ellis-Hutchings M.S., Kral A.M., Liu D., Lumma W.C., Machotka S.V., Rands E., Williams T.M., Graham S.L., Hartmann G.D., Oliff A.I., Heimbrook D.C., Kohl N.E. (2001):** Evaluation of Farnesyl:Protein Transferase and Geranylgeranyl:Protein Transferase Inhibitor Combinations in Preclinical Models. *Cancer Res* 61: 8758-8768
- Louis, J.C., Magal E., Takayama S., Varon S. (1993):** CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 259(5095): 689-692
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951):** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75
- Lublin, F.D., Reingold, S.C. (1996):** Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology*, 46; 907-911.



---

**Mackay D.J., Hall A. (1998):** RhoGTPases. *J Biol Chem* 273(33): 20685-20688

**Manne V., Roberts D., Tobin A., O'Rourke E., De Virgilio M., Meyers C., Ahmed N., Kurz B., Resh M., Kung H.F. (1990):** Identification and preliminary characterization of protein-cysteine farnesyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7541-7545

**Marinissen M.J., Chiariello M., Tanos T., Bernard O., Narumiya S., Gutkind J.S. (2004):** The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol Cell* 14: 29-41

**Matsushima G.K., Morell P. (2001):** The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathol* 11: 107-116

**Matthews R.T., Yang L., Browne S., Baik M., Flint Beal M. (1998):** Coenzyme Q<sub>10</sub> administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Med Sci* 95(15): 8892-8897

**McGlade J., Brunkhorst B., Anderson D., Mbamalu G., Settleman J., Dedhar S., Rozakis-Adcock M., Chen L.B., Pawson T. (1993):** The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J* 12: 3073-3081

**McLaurin J.A., Yong V.W. (1995):** Oligodendrocytes and myelin. *Neurologic Clinics* 13: 23-49

**McMorris A., Dubois-Dalcq M. (1988) :** Insulin-like growth factor I promotes cell proliferation and oligodendroglial commitment in rat glial progenitor cells developing in vitro. *J Neurosci Res* 21: 199-209

**McTaggart, S.J. (2006):** Review Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci* 63: 255-267

**McTavish D., Sorkin E.M. (1991):** Pravastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 42: 65-89

---

**Meier R., Rouse J., Cuenda A., Nebrada A. R., Cohen P. (1996) :** Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur J Biochem* 236: 796-805

**Melendez-Vasquez C.V., Einheber S., Salzer J.L. (2004):** Rho kinase Regulates Schwann Cell Myelination and Formation of Associated Axonal Domains. *J Neurosci* 24(16): 3953-3963

**Mendola C.E., Backer J.M. (1990):** Lovastatin BLOCKS N-ras oncogene-induced neuronal differentiation. *Cell Growth Differ* 1(10): 499-502

**Merkler D., Boretius S., Stadelmann C., Ernsting T., Michaelis T., Frahm J., Brück W. (2005):** Multicontrast MRI of remyelination in the central nervous system. *NMR Biomed* 18: 395-403

**Meske V., Albert F., Richter D., Schwarze J., Ohm T.G. (2003):** Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 17: 93-102

**Meyer-Franke A., Barres B. (1994):** Axon myelination. Myelination without myelin-associated glycoprotein. *Curr Biol* 4: 847-50

**Mi, S., Miller R.H., Lee X., Scott M.L., Shulag-Morskaya S., Shao Z., Chang J., Thill G., Levesque M., Zhang M., Hession C., Sah D., Trapp B., He Z., Jung V., McCoy J.M., Pepinsky R.B. (2005):** LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nature Neurosci* 8: 745-751

**Miller D.J., Rodriguez M. (1995) :** A monoclonal autoantibody that promotes central nervous system remyelination in a model of multiple sclerosis is a natural autoantibody encoded by germline immunoglobulin genes. *J Immunol* 154: 2460-2469

**Minden A., Lin A., Claret F.X., Abo A., Karin M. (1995):** Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81(7): 1147-1157

**Miron V.E., Rajasekharan S., Jarjour A.A., Zamvil S.S., Kennedy T.E., Antel J.P. (2007):** Simvastatin regulates oligodendroglial process dynamics and survival. *Glia* 55(2): 130-143

**Molnar, G., Dagher M.C., Geiszt M., Settleman J., Ligeti E. (2001):** Role of prenylation in the interaction of Rho-family small GTPases with GTPases activating proteins. *Biochem* 40(35): 10542-10549

**Moon S.Y., Zheng Y. (2003):** Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13: 13-22

**Morell P., Quarles R.H., Nortoon W.T. (1994):** Myelin formation, structure and and biochemistry. In: *Basic Neurochemistry*, 5<sup>th</sup> Edition, edited by Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. New York: Raven, 117-143

**Mosmann T. (1983):** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 : 55-63

**Mueller B.K., Mack H., Teusch N. (2005):** Rho Kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature Rev Drug Discov* 4: 387-398

**Multiple Sklerose-Therapie-Konsensus-Gruppe (MSTKG) (1999):** Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose . *Nervenarzt* 70; 371-386.

**Multiple Sklerose-Therapie-Konsensus-Gruppe (MSTKG) (2001):** Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose. *Nervenarzt*, 1. Ergänzung: Dezember 2000. 72; 150-157.

**Multiple-Sklerose-Therapie-Konsensus-Gruppe (MSTKG) (2004):** Symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 75 Suppl 1 August 2004

---

**Nakajima K., Kohsaka S. (2001):** Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biol* 130: 169-175

**Nakano K., Takaishi K., Kodama A., Mammoto A., Shiozaki H., Monden M., Takai Y. (1999):** Distinct actions and Cooperative Roles of ROCK and mDia in Rho Small G Protein-induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell* 10: 2481-2491

**Nave K.A., Salzer J.L. (2006):** Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16: 492-500

**Nègre-Aminou P., van Erck M., van Leeuwen R.E.W., Collard J.G., Cohen L.H. (2001):** Differential effect of simvastatin on various signal transduction intermediates in cultured human smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 61: 991-998

**Neuhaus O., Strasser-Fuchs S., Fazekas F., Kieseier B.C., Niederwieser G., Hartung H.P., Archelos J.J. (2002):** Statins as immunomodulators: Comparison with interferon- $\beta$ 1b in MS. *Neurology* 59: 990-997

**Neuhaus O., Stüve O., Zamvil S.S., Hartung H.P. (2005):** Evaluation of HMG-CoA Reductase Inhibitors for Multiple Sclerosis. Opportunities and Obstacles. *CNS Drugs* 19(10): 833-841

**Neuhoff V., Philipp K., Zimmer H.G., Mesecke A. (1979):** A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Physiol Chem* 360: 1657-1670

**Nikolic M. (2002):** The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 731-745

**Nishizuka Y. (1986):** Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312

- Nobe H., Nobe K., Fazal F., DeLanerolle P., Paul R.J. (2003):** Rho kinase mediates serum-induced contraction in fibroblast fibers independent of myosin LC<sub>20</sub> phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C599-C606
- Nobes C.D., Hall A. (1995):** Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81: 53-62
- Noma K., Oyama N., Liao J.K. (2006):** Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C661-C668
- Norton W.T. (1974):** Isolation of myelin from nerve tissue. *Methods Enzymol* 3: 435-444
- Norton W.T., Cammer W. (1984):** Isolation and characterization of myelin. In *Myelin* 2<sup>nd</sup> Edition, edited by Morell P., Plenum Press, New York, 147-195
- Ochiai H., Uchiyama N., Imagaki K., Hata S., Kamei T. (1997):** Determination of simvastatin and its active metabolite in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with 1-bromoacetylpyrene. *J Chromatogr B* 694: 211-217
- Oertle T., Van der Haar M.E., Bandtlow C.E., Robeva A., Burfeind P., Buss A., Huber A.B., Simonen M., Schnell L., Brösamle C., Kaupmann K., Vallon R., Schwab M.E. (2003):** Nogo-A Inhibits Neurite Outgrowth and Cell Spreading with Three Discrete Regions. *J Neurosci* 23(13): 5393-5406
- Olofsson B. (1999):** Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11: 545-554
- Ong L.L., Lim A.P., Er C.P., Kuznetsov S., Yu H. (2000):** Kinectin-kinesin binding domains and their effects on organelle motility. *J Biol Chem* 275: 32854-32860

**Paintlia A.S., Paintlia M.K., Singh A.K., Stanislaus R., Gilg A.G., Barbosa E., Singh I. (2004):** Regulation of gene expression associated with acute experimental autoimmune encephalomyelitis by Lovastatin. *J Neurosci Res* 77: 63-81

**Paintlia A.S., Paintlia M.K., Khan M., Vollmer T., Singh A.K., Singh I. (2005):** HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis. *FASEB J* 19: 1407-1421

**Papavassilou A.G., Treier M., Bohmann D. (1995):** Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J* 14: 2014-2019

**Pearson G., Robinson F., Gibson T.B., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. (2001):** Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Rev.* 22: 153-183

**Peng X.Y., Jin J.P., Giri S., Montes M., Sujikowski D., Tang Y.N., Smrtka J., Vollmer T., Singh I., Markovic-Plese S. (2006):** Immunomodulatory effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors, potential therapy for relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 178 (1-2): 130-139

**Peters A. (1964):** Observations on the connections between myelin sheaths and glial cells of the optic nerve of young rats. *J Anat* 98: 125-134

**Peterson G.L. (1979):** Review of the Folin Phenol Protein Quantitation of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 100: 201-220

**Pfeiffer S.E., Warrington A.E., Bansal V.S. (1993):** The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3: 191-197

**Plosker G.L., Wagstaff A.J. (1996):** Fluvastatin: a review of its pharmacological and therapeutic potential in the management of hypercholesterolaemia *Drugs* 51: 433-459

---

**Pollmann C., Huang X., Mall J., Bech-Otschir D., Naumann M., Dubiel W. (2001):** The Constitutive Photomorphogenesis 9 Signalosome Directs Endothelial Growth Factor Production in Tumor Cells. *Cancer Res* 61: 8416-8421

**Polman C.H., Killestein J. (2004):** Statins for the treatment of multiple sclerosis: cautious hope. *Lancet* 363: 1570

**Pooler A.M., Xi S.C., Wurtmann R.J. (2006):** The 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor pravastatin enhances neurite outgrowth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 97(3): 716-723

**Pöhlau, D, Aktas O., Epplen C., Hartung H.P., Hoffmann V., Przuntek H. (1998):** Remyelinisierungsförderung als zukünftiges Therapieprinzip der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 68: 841-850

**Prégent E. (2000):** Studying the statins. *CMAJ* 162(8): 1122-1124

**Prineas J.W., Barnard R.O., Kwon E.E., Sharer L.R., Cho E.S. (1993):** Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33: 137-151

**Pringle N., Yu, W.-P., Collarini E.J., Calver A., Hall A., Guthrie S., Richardson W.D. (1997):** Origins and early development of oligodendrocyte precursor cells. In: *Molecular Signaling and Regulation in Glial Cells*. Edited by Jeserich G., Althaus H.H., Richter-Landsberg C., Heumann R., Springer Verlag Berlin-Heidelberg. 3-10

**Raff M.C., Mirsky R., Fields K.L., Lisak R.P., Dorfman S.H., Silberberg D.H., Gregson N.A., Leibowitz S., Kennedy M.C. (1978):** Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature* 274: 813-6; 1978.

**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., Wu E. (1993):** Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 199-204

**Raine, C.S. (1984): Morphology of Myelin and Myelination.** In: *Myelin*, Second Edition, Edited by Pierre Morell, Plenum Press New York, 1-50

**Ranvier L. (1878):** Lecons sur l'Histologie du Systeme Nerveux 2, 85-159. Librairie F. Savy, Paris

**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(2): 309-319

**Ridley A.J., Hall A. (1992):** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399

**Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., Hall A. (1992):** The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 2600-2610

**Ridley A.J. (1995):** Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 5(1): 24-30

**Riento K., Ridley A.J. (2003):** Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4: 446-456

**Rikitake Y., Liao J.K. (2005):** Rho GTPases, Statins, and Nitric Oxide. *Circ Res* 97: 1232-1235

**Rivers T.M., Sprunt D.H., Berry G.P. (1933):** Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58: 39-53

**Robinson M., Cobb M.H. (1997):** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186



**Rodriguez-Gabin A.G., Cammer M., Almazan G., Charron M., Larocca J.N. (2001):** Role of RAB22b, an oligodendrocyte protein, in regulation of transport of vesicles from trans Golgi to endocytic compartments. *J neurosci Res* 66(6): 1149-1160

**Rodriguez-Gabin A.G., Almazan G., Larocca J.N. (2004):** Vesicle transport in oligodendrocytes: probable role of Rab40c protein. *J Neurosci Res* 76(6): 758-770

**Rohde G. (1998):** Effekt von NGF auf die Remyelinisation von experimentell demyelinisierten Arealen im Corpus Callosum des Göttinger Miniaturschweines. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

**Rosenberg S.S., NG B.K., Chan J.R. (2006):** The Quest for Remyelination: A New Role for Neurotrophins and Their Receptors. *Brain Pathol* 16: 288-294

**Rumsby M., Afsari F., Stark M., Hughson E. (2003):** Microfilament and Microtubule Organization and Dynamics in Process Extension by Central Glia-4 Oligodendrocytes: Evidence for a Microtubule Organizing Center. *Glia* 42: 118-129

**Sahai E., Olson M.F., Marshall C.J. (2001):** Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* 20(4): 755-766

**Sahai E. (2002):** p53 Moves Into Control of Cell Morphology. *Mol Interv* 2: 286-289

**Saher G., Brügger B., Lappe-Siefke C., Möbius W., Tozawa R., Wehr M, Wieland F., Ishibashi S., Nave K.A. (2005):** High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nature Neurosci*, April 8 (4):468-475

**Sander E.E., ten Klooster J.P. van Delft S., van der Kammern R.A., Collard J.G. (1999):** Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147: 1009-1022

**Sasaki T., Kato M., Takai Y. (1993):** Consequences of Weak Interaction of rhoGDI with the GTP-bound Forms of *rho* p21 and *rac* p21. J Biol Chem 268(32): 23959-23969.

**Sato-Suzuki I., Murota S. (1996):** Simvastatin inhibits the division and induces neurite like outgrowth in PC12 cells. Neurosci Lett 220(1): 21-24

**Sättler M.B., Diem R., Merkler D., Demmer I., Boger I., Stadelmann C., Bähr M. (2005):** Simvastatin treatment does not protect retinal ganglion cells from degeneration in a rat model of autoimmune optic neuritis. Exp Neurol 193: 163-171

**Schenk, B., Fernandez F., Waechter C.J. (2001):** The ins(ide) and outs(ide) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum. Glycobiology 11(5): 61R-70R

**Schmidt A., Hall A. (2002):** Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. Genes Dev 16: 1587-1609

**Schmitz M. (2006):** Expression und Funktion von Caveolin bei glialen Zellen, insbesondere Oligodendrozyten. Dissertation

**Schulz J.G., Bosel J., Stoeckel M., Megow D., Dirnagl U., Endres M. (2004):** HMG-CoA reductase inhibition causes neurite loss by interfering with geranylgeranylpyrophosphate synthesis. J Neurochem 89: 24-32

**Sebti, S.M., Der C.J. (2003):** Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors. Nature Rev 3: 945-951

**Sena A., Pedrosa R., Graca Morais M (2003):** Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. J Neurol 250: 754-755

**Sena A., Pedrosa R., Graca Morais M. (2004):** Statins for Multiple Sclerosis. Lancet 364: 412

---

**Sepp-Lorenzino L., Coleman P.S., Larocca J.N. (1994):** Isoprenylated Proteins in Myelin. *J Neurochem* 62: 1539-1545

**Shi, J., Wei L. (2007):** Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp* 55: 61-75

**Siddals K.W., Marshman E., Westwood M., Gibson J.M. (2004):** Abrogation of IGF-I and insulin action by mevalonic acid depletion: synergy between protein prenylation and receptor glycosylation pathways. *J Biol Chem* 279(37): 38353-38359

**Simard M., Nedergaard M. (2004):** The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neurosci* 129: 877-896

**Simons M., Kramer E.M., Thiele C., Stoffel W., Trotter J. (2000):** Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* 151: 143-154

**Sjöstrand F. (1949):** SEM study of the retinal rods in the guinea-pig eye. *J Cell Comp Physiol* 33: 383–398, 1949.

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

**Song J., Goetz B.D., Baas P.W. (2001):** Cytoskeletal Reorganization during the Formation of Oligodendroglial Processes and Branches. *Mol and Cell Neurosci* 17: 624-636

**Stancu C., Sima A. (2001):** Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 5: 378-387

**Stangel M., Harung H.P. (2002):** Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology* 68: 361-376

---

**Stariha R.L., Kikuchi S., Siow Y.L., Pelech S.L., Kim M., Kim S.U. (1997):** Role of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in oligodendroglial process extension. *J Neurochem* 68: 945-953.

**Stariha R.L., Kim S.U. (2001):** Protein Kinase C and Mitogen-Activated Protein Kinase Signalling in Oligodendrocytes. *Microscopy Research and Technique* 52: 680-688

**Steck A.J., Schaeren-Wiemers N. (1999):** Multiple Sklerose: Epidemiologie, molekulare Pathologie und Therapie. *Schweiz Med Wochenschr.* 129: 1764-1768

**Steinman L. (2001):** Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nature Immunology* 2: 762-764

**Stewart R.M., Rosenberg R.N. (1979):** Physiology of glia: glial-neuronal interaction. *Int Rev Neurobiol* 21: 275-309

**Sumi T., Matsumoto K., Nakamura T. (2001):** Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276(1): 670-676

**Sun S.W., Liang H.F., Trinkaus K., Cross A.H., Armstrong R.C., Song S.K. (2006):** Noninvasive Detection of Cuprizone Induced Axonal Damage and Demyelination in the Mouse Corpus Callosum. *Magn Reson Med* 55(2): 302-308

**Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2001):** Small GTP-Binding Proteins. *Physiol Rev* 81 No. 1: 153-208

**Tawara, S., Shimokawa H. (2007):** Progress of the Study of Rho-kinase and Future Perspective of the Inhibitor. *Yakugaku Zasshi* 127(3): 501-514

**Temburni M.K., Jacob M.H. (2001):** New functions for glia in the brain. *PNAS* Vol.98 No.7: 3631-3632

**Thelen K.M., Rentsch K.M., Gutteck U., Heverin M., Olin M., Andersson U., Von Eckardstein A., Björkhem I., Lütjohann D. (2006):** Brain Cholesterol Synthesis in Mice Is Affected by High Dose of Simvastatin but not of Pravastatin. *J Pharmacol Exp Therapeut* 316: 1146-1152

**Thiery J., Brügel M. (2003):** Pleiotrope Effekte der Statine. *Pharm Unserer Zeit* 6: 472-478

**Thomas P.K., Landon D.N., King R.H.M. (1997):** Diseases of the peripheral nerves. In: *Greenfields Neuropathology* 6<sup>th</sup> edn, Vol 2, Graham D.I., Lanton P.L. (eds). Oxford University Press: New York 367-488

**Thurnherr T., Benninger Y., Wu X., Chrostek A., Krause S.M., Nave K.A., Franklin R.J.M., Brakebusch C., Suter U., Relvas J.B. (2006):** Cdc42 and Rac1 Signaling Are Both Required for and Act Synergistically in the Correct Formation of Myelin Sheaths in the CNS. *J Neurosci* 26(40): 10110-10119

**Todd P.A., Goa K.L. (1990):** Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 40: 583-607

**Towbien H., Staehlin T., Gordon J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76: 4350-4354

**Traeger M., Eberhart A., Geldner G., Morin A.M., Putzje C., Wulf H., Eberhart L.H.J. (2003):** Künstliche neuronale Netze. *Anästhesist* 52: 1055-1061

**Trapp BD, Bernier L, Andrews SB, Colman DR (1988):** Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *J Neurochem* 51:859-868

**Valencia A, Chardin P., Wittinghofer A., Sander C. (1991):** The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 30: 4637-4648

---

**Vaughan C.J., Gotto A.M. Jr., Basson C.T. (2000):** The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 35: 1-10

**Vecchione C., Brandes R.P. (2002):** Withdrawal of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Elicits Oxidative Stress and Induces Endothelial Dysfunction in Mice. *Circ Res* 91(2): 173-179

**Velho J.A., Okanobo H., Degasperi G.R., Matsumoto M.Y., Alberici L.C., Cosso R.G., Oliveira H.C.F., Vercesi A.E. (2006):** Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicol* 219: 124-132

**Vignal E., Blangy A., Martin M., Gauthier-Rouvière C., Fort P. (2001) :** Kinectin Is a Key Effector of RhoG Microtubule-Dependent Cellular Activity. *Mol Cell Biol* 21(23): 8022-8034

**Vigorito E., Bell S., Hebeis B.J., Reynolds H., McAdam S., Emson P.C., McKenzie A., Turner M. (2003):** Immunological Function in Mice Lacking the Rac-Related GTPase RhoG. *Mol Cell Biol* 24(2): 719-729

**Virchow R (1854):** Über das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den tierischen Geweben. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 6:562-572.

**Virdee K., Tolkovsky A.M. (1996):** Inhibition of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase activity by PD98059 does not suppress nerve growth factor-induced survival of sympathetic neurons. *J Neurochem* 67: 1801-1805

**Vojtek A.B., Hollenberg S.M., Cooper J.A. (1993):** Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74: 205–214

**Vollmer T., Key L., Durkalski V., Tyor W., Corboy J., Markovic-Plese S., Preiningerova J., Rizzo M., Singh I. (2004):** Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 363: 1607-1608

- Vree T.B., Dammers E., Ulc I., Horkovics-Kovats S., Ryska M., Merckx I. (2001):** Variable Plasma/Liver and Tissue Esterase Hydrolysis of Simvastatin in Healthy Volunteers after a Single Oral Dose. *Clin Drug Invest* 21(9): 643-652
- Warne P.H., Viciano P.R., Downward J. (1993):** Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364: 352–355
- Wassermann S. (1998):** FH proteins as cytoskeletal organisers. *Trends Cell Biol* 8: 111-115
- Watanabe N., Kato T., Fujita A., Ishizaki T., Narumiya S. (1999):** Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* 1: 136-143
- Watson F.L., Porcionatto M.A., Bhattacharyya A., Stiles C.D., Segal R.A. (1999):** TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol* 2: 323-336
- Weber M.S., Prod'homme T., Steinman L., Zamvil S.S. (2005):** Drug Insight: using statins to treat neuroinflammatory disease. *Nature Clin Pract Neurol* 1(2): 106-112
- Weitz-Schmidt G., Welzenbach K., Brinkmann V, Kamata T, Kallen J., Bruns C., Cottens S., Takada Y., Hommel U. (2001):** Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 7: 687-692
- Weitz-Schmidt G. (2002):** Statins as anti-inflammatory agents. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.23 No.10: 482-486
- Weitz-Schmidt G., Welzenbach K., Dawson J., Kellen J. (2004):** Improved lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) inhibition by statin derivatives – Molecular basis determined by X-ray analysis and monitoring of LFA-1 conformational changes in vitro and ex vivo. *J Biol Chem* 279(45): 46764-46771
- Wekerle H. (2002):** Tackling multiple sclerosis. *Nature* 420: 39-40

**Wennerberg K., Ellerbroek S.M., Liu R.Y., Karnoub A.E., Burridge K., Der C.J. (2002):** RhoG Signals in Parallel with Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* 277(49): 47810-47817

**Wennerberg K., Der C.J. (2004):** Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117: 1301-1312

**Willumsen, B.M., Christensen A., Hubbert N.L., Papageorge A. G., Lowy D.R. (1984):** The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 310: 583-586

**Wilson R., Brophy P.J. (1989):** Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination. *J Neurosci Res* 22: 439-448

**Wolf R.M., Draghi N., Liang X., Dai C., Uhrbom L., Eklöf C., Westermark B., Holland E.C., Resh M.D. (2003):** p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human Chromosome 19q13.3. *Genes Dev* 17(4): 476-487

**Wood P., Bunge R.P. (1984):** The biology of the oligodendrocyte. In *Oligodendroglia* (W.T. Norton, Ed.), pp. 1-46. Plenum Press, New York, NY.

**Xia Y., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., Greenberg M.E. (1995):** Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Sci* 270: 1326-1331

**Yakovlev P.I., Lecours A.R. (1966):** The myelinogenic cycles of regional maturation of the brain. In: *Regional Development of the Brain in early Life*, edited by Minkovski A. Oxford, UK: Blackwell, 1966: 3-70

**Yamashita T., Tohyama M. (2003):** The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6: 461-467



---

**Yao D.-L., Liu X., Hudson L.D., Webster Hd. (1995):** Insulin-like growth factor 1 treatment reduces demyelination and up-regulates gene expression of myelin-related proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6190-6194

**Youssef S. Stüve O., Patarroyo J.C., Ruiz P.J., Radosevich J.L., Mi Hur E., Bravo M., Mitchell D.J., Sobel R.A., Steinman L., Zamvil S.S. (2002):** The HMG-CoA-reductase inhibitor atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420: 78-84

**Zalcman G., Dorseuil O., Garcia-Ranea J. A., Gacon G. and Camonis J. (1999):** RhoGAPs and RhoGDIs, (Hi)stories of two families. *Prog Mol Subcell Biol* 22: 85-113

**Zhang Q., Magnusson M.K., Moshert D.F. (1997):** Lysophosphatidic Acid and Microtubule-destabilizing Agents Stimulate Fibronectin Matrix Assembly through Rho-dependent Actin Stress Fiber Formation and Cell Contraction. *Mol Biol Cell* 8: 1415-1425

**Zhao J.J., Xie I.H., Yang A.Y., Roadcap B.A., Rogers J.D. (2000):** Quantification of simvastatin and its  $\beta$ -hydroxy acid in human plasma by liquid-liquid cartridge extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35: 1133-1143

## VII Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (100 pm)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat-Stammlösung
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Antikörperverdünungspuffer
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	destilliertes Wasser
Ara-C	Cytosin-1-beta-D-Arabinofuranosid
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
b. wt.	Körpergewicht (body weight)
bzw.	beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid-Dihydrat
cDNA	copy DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DIV	Tage in Kultur (days in vitro)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FPP	Farnesylpyrophosphat
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
g	Gramm

---

GBq	Gigabequerel
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGTI	Geranylgeranyltransferase-Inhibitor
Grb2	Growth Factor Receptor - bound Protein 2
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HP	Hexose-Phosphat-Puffer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
JNK	c-Jun-Amino (n)-terminale Proteinkinase
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
L-[U- <sup>14</sup> C]-Leucin	Leucin mit radioaktiv markiertem Kohlenstoffatom
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	basisches Myelinprotein (Myelin Basic Protein)
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MEKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
mCi	Millicurie (radioaktive Einheit)
MEM	Minimal Essential Medium-Earle
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
µg	Mikrogramm

---

$\mu\text{l}$	Mikroliter
ml	Milliliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MOG	Myelin/Oligodendrozyten Glykoprotein
mOs	Milliosmol
MOSP	Myelin/Oligodendrozyten spezifisches Protein
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MTT	Diphenyltetrazoliumbromid
Na	Natrium
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaF	Natriumfluorid
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Natriumdihydrogenphosphat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	Natrium-Orthovanadat
NGF	Nerve Growth Factor
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet-P40
OD	optische Dichte
OL	Oligodendrozyten
PAS	Perjodic acid Schiff
PBS	Phosphat-buffered Saline
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}^+$ Ionen Konzentration
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol3-Kinase
$\text{PIP}_2$	Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat
$\text{PIP}_3$	Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC- $\gamma$ 1	Phospholipase C- $\gamma$ 1
PLP	Proteolipidprotein
PMSF	Phenylmethan-Sulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid

---

REM	Rasterelektronenmikroskop
RIPA	Lysepuffer
rpm	Umdrehungen pro Minute (roads per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
siRNA	short interference RNA
Sos	Son of sevenless
Sst	Simvastatin
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	TBS/Tween-20
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Trk	Tyrosin Receptor Kinase
u.a.	unter anderem
U	Units
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen bezogen auf Volumen
(w/v)	Einwaage bezogen auf Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z. Zt.	zurzeit
ZNS	Zentrales Nervensystem
[ $\gamma$ <sup>33</sup> -P]-ATP	ATP mit radioaktiv markiertem Phosphat

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.H. Althaus für die Überlassung des sehr interessanten und vielseitigen Themas dieser Dissertation, sein ständiges Interesse am Fortgang und einer erfolgreichen Fertigstellung der Arbeit auch über das Ende seiner „Dienstzeit“ hinaus sowie seine zahlreichen Ratschläge auch in privaten Belangen. In einer solch „familiären“ Umgebung habe ich mich während meiner Promotion stets sehr wohl gefühlt.

Herrn Prof. Dr. G. Jeserich danke ich herzlich für die Betreuung meiner extern angefertigten Dissertation, seine Bemühungen während dieser Zeit und die Freundlichkeit, mit der ich in Osnabrück empfangen wurde. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. R. Brandt für die Übernahme des Korreferats.

Bei meinen Kollegen Sabine Klöppner und Matthias Schmitz bedanke ich mich für die nette Aufnahme in der Arbeitsgruppe, die Hilfsbereitschaft und perfekte Zusammenarbeit sowie die zahlreichen netten Unterhaltungen. Auch wenn es mal „schlechte“ Tage gab, haben wir sie gemeinsam immer super gemeistert. Die vielen „Gaumenfreuden“ und der tägliche Cappuccino werden mir sehr fehlen.

Herrn Prof. Dr. W. Brück, Herrn Dr. D. Merkler und allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie gilt mein Dank für die Kooperation zur Durchführung der in vivo Versuche sowie die stets nette Zusammenarbeit und Hilfe. Für die Anfertigung rasterelektronenmikroskopischer Abbildungen möchte ich mich bei Herrn Dr. P. Schwartz bedanken. Bei der Arbeitsgruppe von Dr. Simons bedanke ich mich für die Bereitstellung der Mäuse-Oligodendrozyten.

Ein großes Dankeschön gilt meiner lieben Freundin Tina, dass sie immer für mich da war und für ihr Verständnis und Zuspruch während der doch anstrengenden Zeit des Zusammenschreibens dieser Arbeit. Meinem Mitbewohner und besten Freund Christian danke ich für ein immer offenes Ohr und die vielen aufbauenden Worte. Dieser Dank gilt ebenso meiner Schwester Sina und meinem Schwager Micha, auch für die vielen Ratschläge während meiner Promotion.

Der wohl größte Dank gilt meinen lieben Eltern, Heidi und Norbert Klopffleisch, dass sie mir all dies ermöglicht und mich stets mit vollster Liebe, Unterstützung und ihrem Verständnis auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet haben.

Teile dieses Projektes wurden von der Hertie-Stiftung (Grant 1.01.1/04/004) finanziert.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder Sinn nach anderen wissenschaftlichen Arbeiten entlehnt sind, wurden unter Angabe der Referenz immer als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

(Ort,Datum)

---

(Unterschrift)