Aus der Neurologischen Klinik

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

Charakterisierung der Sirt1 Expression im Mausgehirn

– speziell in den Oligodendrozyten –

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Denise Eckstein

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Aktas

Korreferent: Prof. Dr. Schulz

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Poster

D. Eckstein, T. Prozorovski, J. Ingwersen, P. Göttle, B. Koop, J. Klose, F. Schröter, H.-P. Hartung, P. Küry, O. Aktas: Characterization of Sirt1 expression in the course of autoimmune demyelination, ECTRIMS/ACTRIMS, 19-22 October 2011, Amsterdam, The Netherlands

T. Prozorovski, D. Eckstein, J. Ingwersen, P. Göttle, B. Koop, J. Klose, F. Schröter, H.-P. Hartung, P. Küry, O. Aktas: Role of Sirt1 in oligodendrocyte progenitors in autoimmune neuroinflammation, EuroGlia, 13-17 September 2011, Prague, Czech Republic

T. Prozorovski, D. Eckstein, J. Ingwersen, B. Koop, R. Schneider, F. Schröter, C. Berndt, H.-P. Hartung, P. Küry, O. Aktas: Sirt1 regulates neural stem cell homeostasis and plays a role in the response to cellular stress, 6th International Meeting, 5-6 April 2011, Essen, Deutschland

Zusammenfassung

Sirt1 ist eine biologisch hoch konservierte Histon-Deazetylase (HDAC) der Gruppe III, die über einen Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD+) abhängigen Mechanismus die Lysinreste in Proteinen deazetyliert und zahlreiche relevante zellbiologische Funktionen ausübt. In den Stammzellnischen des adulten Gehirns existieren selbst erneuernde neurale Vorläuferzellen (NVZ), die Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten generieren können. Es ist bekannt, dass Sirt1 in die Differenzierung von NVZ involviert ist, unter oxidativen Bedingungen die Differenzierung in Richtung der Astrozyten lenkt und unter den entzündlich demyelinisierenden Bedingungen der EAE (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose) vermehrt exprimiert wird (5). Die mangelnde Remyelinisierung in diesen Erkrankungen ist unter anderem auf unzureichende Regenerationsfähigkeit der Oligodendrozyten zurückzuführen. Einerseits ist bekannt, dass HDAC der Gruppen I und II für die gezielte Differenzierung von Oligodendrozyten notwendig sind (99). Andererseits wurde in Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ) mit ausgeschalteter Sirt2 Funktion (HDAC Gruppe III) *in vitro* eine Differenzierung der Zellen in ein reiferes Stadium beobachtet (81). Der Einfluss von Sirt1 auf die Zelllinie der Oligodendrozyten hingegen ist weitgehend unbekannt. Daher stellte sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob auch Sirt1 sich in den Zellen der Oligodendrozytenlinie findet, dort einen Einfluss auf die Differenzierung hat und ob die Expression von Sirt1 dort sich in der EAE verändert.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst eine Charakterisierung der physiologischen Expressionsmuster von Sirt1 im gesunden Mausgehirn mittels Immunfluoreszenz (IF) und qRT-PCR, gefolgt von *in vitro* Experimenten zur spontanen Differenzierungsfähigkeit von Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ (konditioneller Knockout des katalytischen Zentrums (129Sv.129Sv (C57BL/6)-SIRT1tm)) und einer Analyse der Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mausembryonen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern. Die Sirt1 Expression in der EAE in C57/B6 Mäusen wurde via qRT-PCR, IF und Western Blot analysiert.

Es stellte sich heraus, dass Sirt1 in den Keimzellregionen (SVZ und SGZ) des adulten Mausgehirnes in multipotenten Stammzellen (Nestin/Sox2), aber auch in den spezifischen OVZ (PDGFR) exprimiert wird. Weiterhin fand sich Sirt1 im Kleinhirnmark adulter Mausgehirne in differenzierten Oligodendrozyten, aber vor allem in den OVZ. Bei Abwesenheit funktionalen Sirt1 Proteins in Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ-Kulturen *in vitro* war im qRT-PCR Screening eine Reduktion von Zellzyklusinhibitoren (wie zum Beispiel p21 und PTEN) und Inhibitoren der OVZ Differenzierung (wie zum Beispiel Hes5 und insbesondere ID2) nachweisbar. Im Einklang damit waren die Marker der OVZ Differenzierung (Mash1, Sox10) erhöht. In der Immunhistochemie der Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ-Kulturen konnte dieser Effekt der Induktion der Oligodendrozytendifferenzierung bei Verlust des funktionalen Sirt1 Proteins ebenfalls gezeigt werden. Dies wird durch unsere Beobachtung unterstützt, dass Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse (E17) in der Mehrzahl eine deutlich verfrühte Expression der Myelinmarker (MBP, CNPase) zeigten. Die Stammzelllokalisation und –anzahl (Sox2) war in diesen Tieren nicht verändert. Sirt1 wurde unter den inflammatorischen Bedingungen der EAE im Kleinhirn induziert. Sirt1 fand sich aber nicht in der ortsständigen Mikroglia (Iba1) und nur vereinzelt in einwandernden Monozyten (Ly6c). Sirt1 war in den OVZ (PDGFα, NG2) im Kleinhirnmark unter den Bedingungen der EAE signifikant vermehrt exprimiert.

Zusammenfassend ergaben sich Hinweise, dass Sirt1 die Differenzierung zu reifen Oligodendrozyten inhibiert. Dies konnte unlängst durch eine unabhängige Publikation bestätigt werden (6). Es könnte durch selektive Sirt1 Inaktivierung ein neuer Ansatz in der regenerativen Therapie demyelinisierender Erkrankungen gefunden werden.

Abkürzungsverzeichnis

AEP akustisch evozierte Potentiale
AK Antikörper
APC Antigen präsentierende Zelle
bp Basenpaare
BER Basen Exzisions Reparatur
BHS Blut-Hirn-Schranke
BrdU Bromodeoxyuridin
BSA bovines Serum Albumin
CC Corpus callosum
cDNA *complementary* Desoxyribonukleinsäure
CFA Freund's *complete adjuvant*
DMSO Dimethylsulfoxid
EAE Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
EBV Epstein-Barr Virus
FCS fötales Kälberserum
FPA *Fore limb paresis* = inkomplette Vorderbeinlähmung
FPL *Fore limb plegia* = vollständige Vorderbeinlähmung
fw *forward*
g x-fache Erdbeschleunigung
GalC Galaktocerebrosid, Marker für Oligodendrozyten
GFAP *glial fibrillary acidic protein*, Marker für Gliazellen, insbesondere Astrozyten und Stammzellen
GH *growth hormon*
HDAC Histon Deazetylase
HLP *Hind limb paresis* = unvollständige Hinterbeinlähmung
IF Immunfluoreszenz
IFNγ Interferon γ
IGF-1 *Insulin like growth factor*
IgG Immunglobulin G
IHC Immunhistochemie
M mol/L
MBP *Myelin basic protein*
MOG Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA *messenge*r RNA
MRT Magnetresonanztomographie
MS Multiple Sklerose
NAD+ Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAM Nikotinamid
Nampt Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase
NAWM *normal appearing white matter*
NES nukleare Export Sequenz
NFκB *nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells*
NVZ Neurale Vorläuferzelle ≙ *Neural Progenitor Cell (NPC)*
OVZ Oligodendrozytenvorläuferzelle= *Oligogendrocyte Precursor Cell (OPC)*
OVA Ovalbumin
PARP1 Poly-(ADP Ribose)- Polymerase 1
PBS *phosphate buffered saline*
PCR Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGFRα *platelet-derived growth factor receptor α subunit*, Marker für OPCs
PLP Proteolipoprotein
PPMS primär progressive Multiple Sklerose
PTX Pertussistoxin
RM Rückenmark
RMS *rostral migratory stream* = rostraler Migrationsstrom
RNA Ribonukleinsäure
rpm *rounds per minute*
RRW *Rightning reflex weak* = Zurückdrehreflex schwach
RT Raumtemperatur
SEP somatosensibel evozierte Potentiale
Sirt1 *silent mating type information regulation 2 homologue 1*
SGZ subgranulare Zone
SVZ subventrikulare Zone
TNF Tumor-Nekrose-Faktor
TPA *Tail paresis* = inkomplette Schwanzlähmung
TPL *Tail Plegia* = vollständige Schwanzlähmung
TRAIL *TNF-related apoptosis inducing ligand* = TNF-assoziierter Apoptose induzierender Ligand
TSA Trichostation A = Inhibitor HDAC I und II
VEP visuell evozierte Potentiale
VMH ventromedialer hypothalamischer Nucleus
VPA Valproinsäure = Inhibitor HDAC I und II
WB *Western Blot*
ZNS Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Publikationen **3**
Zusammenfassung **4**
Abkürzungsverzeichnis **5**
Inhaltsverzeichnis **0**
1 Einleitung **1**
1.1 Multiple Sklerose *1*
1.1.1 Multiple Sklerose - Pathogenese ***1***
1.1.2 Multiple Sklerose - Diagnostik ***2***
1.1.3 Multiple Sklerose - Prognose ***4***
1.1.4 Multiple Sklerose – Therapie ***5***
1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) - Tiermodell *5*
1.3 Sirt1, eine Histondeazetylase der Gruppe III *7*
1.3.1 Sirt1 Lokalisation im adulten ZNS ***11***
1.3.2 Sirt1 in Vorläuferzellen des zentralen Nervensystem – Zelldifferenzierung ***11***
1.3.3 Sirt1 und entzündliche Prozesse im ZNS, speziell EAE ***11***
1.4 Sirtuine – eine homogene Gruppe? *12*
1.4.1 Sirt2 ..... ***13***
1.4.2 Die mitochondrialen Sirtuine: Sirt3, Sirt4 und Sirt5 ..... ***13***
1.4.3 Sirt6 ..... ***14***
1.4.4 Sirt7 ..... ***14***
1.5 Oligodendrozytenlinie – von NVZ zu reifen Oligodendrozyten *15*
1.5.1 Übersicht über Spezifizierung und Differenzierung - Oligodendrozytenentwicklung ***16***
1.5.2 Sox10 ..... ***17***
1.5.3 Mash1 (ASCL1) ***18***
1.5.4 Olig1 und Olig2 ..... ***18***
1.5.5 NG2 ..... ***18***
1.5.6 PDGFRα ***19***
1.5.7 Marker der reifen Oligodendrozyten – MBP, CNPase, GalC und O4 ..... ***19***
1.5.8 Weitere genutzte Marker für Zellfunktionen ***20***
1.6 Keimzellregionen des zentralen Nervensystems der Maus *21*
1.6.1 Subventrikuläre Zone (SVZ) ***21***
1.6.2 Subgranulare Zone (SGZ) ***21***
1.7 Fragestellung *23*
2 Material und Methoden **25**
2.1 Geräte *25*
2.2 Verbrauchsmaterialien: *25*
2.3 Reagenzien und Chemikalien: *25*
2.4 Zellkulturmedien und (Wachstums-)faktoren *26*
2.5 Zellkulturen *27*
2.5.1 Isolation von neuronalen Vorläuferzellen (NVZ) ***27***
2.5.2 Isolation von Vorläuferzellen aus adulten Mäusen ***27***
2.5.3 Passagieren und Mediumwechsel ***27***
2.5.4 Vorbereitung der Poly-L-Ornithin Beschichtung ***28***
2.5.5 Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen ***28***
2.6 RNA Isolation *28*
2.6.1 RNA Isolation aus kultivierten Zellen ***28***
2.6.2 RNA Isolation aus verschiedenen Anteilen des ZNS, peqGOLD Trifast™ ***29***
2.7 Reverse Transkription der RNA in cDNA *29*
2.8 qRT-PCR *30*
2.9 Versuchsaufbauten spezieller Zellkulturexperimente *32*
2.9.1 Versuchsaufbau der Alterung von NVZ in vitro ***32***
2.9.2 Stimulation mit Interferon γ in TSA3 Zellen ***33***
2.9.3 Oligodendrozytendifferenzierung in Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ ex vivo ***33***

2.10 Immunhistologie *34*
2.10.1 Aufarbeitung der Gehirne für die indirekte Immunhistochemie ***34***
2.10.2 Indirekte Immunofluoreszenz ***35***
2.10.3 Quantifizierung der immunhistologischen Gewebsschnitte ***36***
2.10.4 Immunohistochemie – ABC Methode (Vectastain Elite ABC Kit) ***38***
2.10.5 Spezifität unseres neuen chSirt1 Antikörpers ***39***
2.11 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse *39*
2.12 Sox10-EGFP Reporter Mäuse *40*
2.13 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) *40*
2.13.1 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis - Aktive Immunisierung ***40***
2.13.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis - Passive Immunisierung ***41***
2.13.3 Scoring der Tiere ***41***
2.14 Verwendete Software *42*
3 Ergebnisse **43**
3.1 Lokale Expressionsmuster von Sirt1 im ZNS der Maus – Veränderung im Alter *43*
3.1.1 Sirt1 in Keimzellregionen der adulten Maus – Immunhistologie ***43***
3.1.2 Sirt1 in Gliazellen des Kleinhirns– Immunhistologie ***44***
3.1.3 Erhöhte Sirt1 RNA-Expression im Alter - in vitro und in vivo ***47***
3.2 Analyse von Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Tieren und Zellen *49*
3.2.1 Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Tiere – Korrelation von Sirt1 und Sox10/ Sox9 in SVZ ***49***
3.2.2 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ in vivo – Einfluss auf undifferenzierte multipotente Stammzellen und die embryonale Oligodendrozytenentwicklung ***51***
3.2.3 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ ex vivo – gesteigerte Differenzierung zu Oligodendrozyten ***57***
3.3 Sirt1 Expressionsmuster bei autoimmuner Demyelinisierung *60*
3.3.1 Induktion von Sirt1 auf RNA- und Proteinebene in der EAE im Kleinhirn ***60***
3.3.2 Einfluss entzündlicher Mechanismen auf die Sirt1 Induktion ***62***
3.3.3 Welche Zellen exprimieren Sirt1 in der EAE? – Analyse in der IHC ***65***
3.3.4 Analyse der Sirt1 Aktivität in der EAE ***67***
4 Diskussion **68**
4.1 Lokale Expressionsmuster von Sirt1 im ZNS der Maus und Veränderung im Alter *68*
4.1.1 Das Sirt1 Protein zeigte Koexpression mit Stammzellmarkern und Markern der OVZ in adulten Keimzentren des Mausgehirnes ***68***
4.1.2 Sirt1 fand sich vor allem in reifen Oligodendrozyten und OVZ im Kleinhirnmark ***70***
4.1.3 Sirt1 war im Alter in der qRT-PCR signifikant erhöht ***70***
4.2 Analyse von Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Tieren und Zellen – Sirt1 Inhibition hat Einfluss auf die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Oligodendrozyten *71*
4.2.1 Sirt1 mRNA korreliert in der SVZ mit Sox9 und Sox10 mRNA ***71***
4.2.2 Sirt1 scheint Einfluss auf die embryonale Differenzierung von OVZ zu nehmen ***72***
4.2.3 Inhibition der Sirt1 HDAC Funktion hat Einfluss auf die Differenzierung von Oligodendrozyten ***73***
4.3 Gesteigerte Expression des Sirt1 in OVZ in der EAE *75*
4.3.1 Sirt1 Induktion im Kleinhirn während aktiver EAE ***75***
4.3.2 Theorien der Sirt1 Induktion in der EAE ***76***
4.3.3 Gesteigerte Sirt1 Expression in OVZ in der EAE ***77***
4.3.4 Sirt1 Aktivität und Wirkung in der EAE ***77***
5 Schlussfolgerung **80**
6 Literaturverzeichnis **81**
7 Anhänge **92**
Anhang A: Alterung von NVZ in vitro. *92*
Anhang B: Vergleich Sirt1Δex4/Δex4 versus Wildtyp Embryos (E 16). *93*
Anhang C: Olig2 und GFAP im Vergleich in Sirt1Δex4/Δex4 versus Wildtyp NVZ *94*
Anhang D: Geninduktion (qRT-PCR) *95*
Anhang E: qRT-PCR Analysen aus TSA3 Zellen *95*
Danksagung **96**
Eidesstattliche Versicherung **97**

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Prävalenz der Multiplen Sklerose (MS) liegt bei 1 zu 1.000, wobei Frauen zweimal häufiger betroffen sind als Männer. Der Haupterkrankungszeitraum dieser entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (7). Die genaue Ätiologie ist unbekannt, aber es wird ein Zusammenhang zwischen exogenen Einflüssen und bestimmten mittlerweile identifizierten genetischen Faktoren (Polymorphismen) vermutet (8), die das MS-Erkrankungsrisiko erhöhen. Als exogene Einflüsse werden das Epstein-Barr Virus (EBV), eine Vitamin D Unterversorgung und das Rauchen postuliert (9). Interessant ist, dass sich die geographische Ausbreitung der MS besonders auf den mitteleuropäischen und mittelamerikanischen Raum fokussiert und diese Ausbreitung mit der Verbreitung des EBV korriliert. Ebenfalls sind im Vergleich zu gesunden Alterskameraden mehr MS kranke Kinder seropositiv für EBV (10). MS-Patienten haben einen signifikant niedrigeren Vitamin D Spiegel und scheinen von einer Substitution bis zu normalen Serumspiegeln zu profitieren (11).

1.1.1 Multiple Sklerose - Pathogenese

Durch eine Fehlregulation des Immunsystems kommt es im Blut zu einer übermäßigen Vermehrung von T-Zellen (TH1), die autoreaktiv gegen Myelin-Proteine gerichtet sind. Obwohl sich nur in einem kleinen Prozentsatz der MS-Patienten Myelin-Autoantikörper im Blut nachweisen lassen, ist durch eine deutliche therapeutische Verbesserung in B-Zell-supprimierten MS Patienten die Bedeutung der B-Zellen in der Pathogenese unterstrichen worden (12). Der genaue Mechanismus dieser Wirkung des Rituximabs (chimärer monoklonaler Antikörper gegen das CD-20 Antigen auf B-Lymphozyten) ist unbekannt. Auch können zum Beispiel Autoantikörper gegen Neurofaszin, einem neuralen Protein im Bereich der Ranvierschen Schnürringe, einen axonalen Schaden hervorrufen (13). Durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen können aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) durchdringen und dort durch professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC; dies sind dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten) und kostimulierende Faktoren aktiviert werden. Mittels Zytokinen (besonders IL-12 und IL-23) regen die Mikrogliazellen die TH1 Zellen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-17 und IFN-γ) an. Dadurch werden gewebeschädigende Faktoren wie TNF-α, Sauerstoffradikale und verstärkte Phagozytose der Makrophagen und Mikroglia induziert (14). Der eigentliche Schaden, der dann auch in neurologischen Ausfällen resultiert, ist einerseits durch die Schäden an den myelinisierenden Oligodendrozyten und andererseits

durch den eigentlichen axonalen Schaden bedingt, der durch vermehrten Ca^{2+} Einstrom und eine Störung der mitochondrialen Funktion gekennzeichnet ist (15). Dieser axonale Schaden könnte einerseits durch zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten bedingt sein, die von MHC Klasse I Molekülen präsentierte Antigene erkennen und deren Anzahl in ZNS-Läsionen mit der Größe des axonalen Schadens korreliert (16). Andererseits können CD4+ T-Lymphozyten mittels des TRAIL-Rezeptor Systems (TNF-assoziierter Apoptose induzierender Ligand) antigenunabhängig neuronalen Schaden verursachen (17;18). Zu Beginn der Erkrankung überwiegt die Entzündung, im Verlauf nimmt diese und die Regenerationsfähigkeit der Oligodendrozyten über adulte Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (siehe Kapitel 1.5) immer mehr ab und im Gegenzug die Neurodegeneration zu, was in einem reduzierten Hirnvolumen resultiert.

1.1.2 Multiple Sklerose - Diagnostik

MS spezifische Symptome gibt es nicht, die Diagnostik basiert auf drei Säulen. Eine Säule ist die klinische Untersuchung, in der typischerweise Parästhesien, Paresen, eine einseitige Optikusneuritis, Koordinationsstörungen, eine rasche Ermüdbarkeit oder auch Blasenfunktionsstörungen auffallen können. Auffällig ist in bis zu 80 Prozent, dass heiße Umgebungstemperaturen eine vorhandene neurologische Symptomatik verschlimmern können, wobei die genaue Pathogenese nicht abschließend geklärt ist (19). Dieses sogenannte Uhthoff-Phänomen ist nach dem Erstbeschreiber Wilhelm Uhthoff (1853–1927) benannt, der eine vorübergehende Verschlechterung des Sehens seiner Patienten bei ermüdender körperlicher Anstrengung beschrieb (20). Ebenfalls können elektrisierende Missempfindungen bei Beugung des Kopfes über den Rücken bis in die Beine ausstrahlen Dieses Phänomen ist nach Jacques Jean Lhermitte (1877-1959) als Lhermitte-Zeichen bekannt (21). In der Magnetresonanztomographie (MRT) können entzündliche demyelinisierende Herde und Läsionen im zentralen Nervensystem (ZNS) dargestellt werden. Die visuell evozierten Potentiale (VEP) sind bei 40 Prozent aller MS Patienten auffällig (Verlängerung der P100 Latenz); wenn vorher eine Optikusneuritis aufgetreten ist, sogar bei fast 100 Prozent. Auch somatosensibel evozierte Potentiale (SEP) und akustisch evozierte Potentiale (AEP) können durch eine Latenzverlängerung auffallen. MRT und die evozierten Potentiale (EPs) gelten als zweite Säule der MS Diagnostik. Die dritte Säule ist die Liquordiagnostik, da hier in 95 Prozent aller MS Patienten oligoklonale Immunglobulinfraktionen („oligoklonale Banden“) auffallen.

Wichtig für die Diagnose ist immer die zeitliche und räumliche Dissemination, die einerseits durch neue Herde im Verlauf, die zu klinischen Symptomen führen können, und andererseits durch entzündliche Läsionen an mehr als einem Ort im ZNS gekennzeichnet ist. Die diagnostischen Kriterien werden in klinische und notwendige Zusatzkriterien unterteilt (22).

Erst wenn beide erfüllt sind und es keine bessere Erklärung für die klinischen Symptome gibt, kann sicher eine MS diagnostiziert werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien der Multiplen Sklerose *nach McDonald 2001, modifiziert nach Polman 2010 (22).*

Klinische Kriterien	Notwendige Zusatzkriterien
≥ 2 Schübe[a]; ≥ 2 objektivierbare klinisch evidente Läsionen oder 1 objektivierbare klinisch evidente Läsion und begründete Hinweise auf einen vorhergehenden Schub	*Keine, klinische Evidenz ausreichend*
≥ 2 Schübe[a]; 1 objektivierbare klinisch evidente Läsionen	*Räumliche Dissemination durch:* *≥ 1 T2-Läsionen in zwei der vier MS-typischen Regionen des ZNS (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) oder Abwarten auf neuen Schub mit neuer Läsionslokalisation*
1 Schub[a]; ≥ 2 objektivierbare klinisch evidente Läsionen	*Zeitliche Dissemination durch:* *Gleichzeitigen Nachweis von asymptomatischen Gadolinium-aufnehmenden und nicht-aufnehmenden Läsionen zu jeder Zeit oder Nachweis einer neuen T2- und/oder Gadolinium-aufnehmenden Läsion im Kontroll-MRT zeitunabhängig oder Abwarten auf einen neuen Schub*
1 Schub[a]; 1 objektivierbare klinisch evidente Läsionen (≙ CIS (clinically isolated syndrom = monosymptomatisches Ereignis))	*Räumliche und zeitliche Dissemination durch:* *≥ 1 T2-Läsionen in zwei der vier MS-typischen Regionen des ZNS (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) oder Abwarten auf neuen Schub mit neuer Läsionslokalisation UND* *Gleichzeitigen Nachweis von asymptomatischen Gadolinium-aufnehmenden und nicht-aufnehmenden Läsionen zu jeder Zeit oder Nachweis einer neuen T2- und/oder Gadolinium-aufnehmenden Läsion im Kontroll-MRT zeitunabhängig oder Abwarten auf einen neuen Schub*
Schleichende neurologische Progression, auf PPMS (primäre progressive MS) hindeutend	*1 Jahr der Krankheitsprogression (retro- oder prospektiv) plus zwei der drei folgenden Kriterien:* *1. Räumliche Dissemination im Gehirn bewiesen durch ≥ 1 T2-Läsionen in den MS-typischen Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal)* *2. Räumliche Dissemination im Rückenmark (RM) bewiesen durch ≥ 2 T2-Läsionen im RM* *3. Positiver Liquorbefund (Oligoklonale Banden und/oder erhöhter IgG Index)*
a: Ein Schub ist definiert als anamnestisch oder objektiv beobachtetes Ereignis, das typischerweise als akut entzündliches, demyelinisierndes Ereignis ohne Fieber oder Infektion mindestens 24 Stunden angedauert hat	

1.1.3 Multiple Sklerose - Prognose

Es gibt verschiedene klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose. Eine Übersicht ist in Abbildung 1 zu finden.

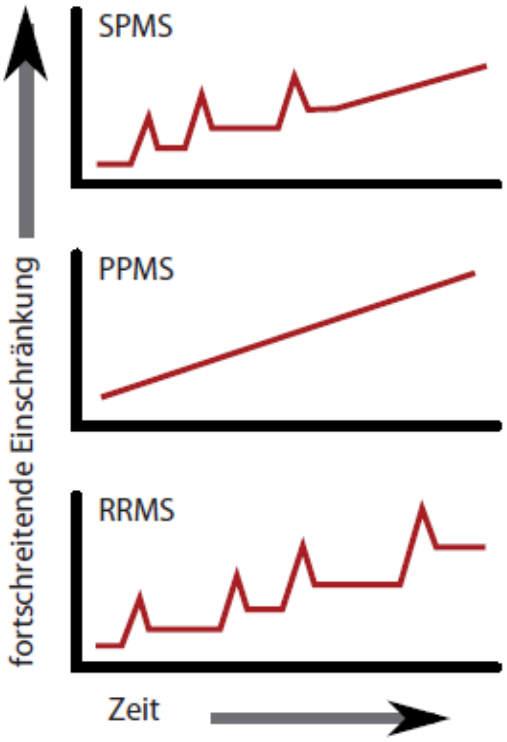


Abbildung 1: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose. Schubförmig remittierender Verlauf (RRMS relapsing remitting MS), Primär progressive MS (PPMS), Sekundär progressive MS (SPMS)
Abbildung in Anlehnung an Lublin 1997 (3).

Bis zu 90 Prozent aller Patienten bieten einen schubförmig remittierenden Verlauf (RRMS) mit symptomfreien Intervallen oder neurologischer Restsymptomatik, aber keiner Progredienz zwischen den Schüben. Diese Form kann bei circa 50 Prozent der Patienten in eine sekundär progressive Form (SPMS) übergehen, bei der die Krankheit nach einiger Zeit schleichend mit progredienter neurologischer Symptomatik voranschreitet. Ungefähr 10 Prozent der Patienten haben von Anfang an einen chronischen voranschreitenden Verlauf; dies wird dann als primäre progressive MS (PPMS) bezeichnet (3). Wichtig ist, dass der klinische Verlauf sehr unterschiedlich ist und von einem initial milden Verlauf mit wenigen Schüben und wenig Einschränkung über mehr als 15 Jahre bis zu ausgeprägten Behinderungen innerhalb von fünf Jahren reichen kann (maligner Verlauf, < 5% der Fälle). Faktoren für einen günstigen Verlauf sind eine kurze Dauer der einzelnen Schübe gepaart mit rascher Rückbildung der neurologischen Symptome, monosymptomatischer Beginn, geringe Läsionslast im MRT, ein Krankheitsbeginn vor dem 40. Lebensjahr, fehlende zerebelläre Symptome bei Krankheitsbeginn und lang anhaltende Gehfähigkeit (14).

1.1.4 Multiple Sklerose – Therapie

Die Therapie der schubförmig remittierenden und sekundär progressiven MS ist komplex und beinhaltet die Therapie des akuten Schubes, die Verringerung der Schubintensität/ -frequenz, die Verzögerung der Progredienz und die symptomorientierte Therapie bzw. Rehabilitation. Der akute Schub wird mit hochdosierten Glukokortikoiden intravenös und evtl. Plasmapherese bei Therapieresistenz behandelt. Zur Therapie der Schubintensität/ -frequenz werden Immunmodulatoren beziehungsweise –suppressoren wie Interferon-beta, Glatirameracetat, Teriflunomid, Fumarsäure sowie eskalierend Natalizumab (humanisierter monoklonaler Antikörper gegen α4-Integrin), Mitoxantron und Fingolimod (Sphingosin-1-Phosphat-Analogon) eingesetzt. Im Gegensatz dazu stehen regenerative Therapieansätze wie die Transplantation von Stammzellen und Behandlung mit Wachstumshormonen zur Regeneration der geschädigten Myelinscheiden, die zur Zeit aber lediglich im Rahmen präklinischer Studien untersucht werden und noch nicht bis in die flächendeckende Basistherapie geführt werden konnten. Insbesondere das Regenerationspotential der vorhandenen endogenen Vorläuferzellen der Oligodendrozyten könnte zur Etablierung regenerativer Therapieansätze beitragen, da durch eine gezielte Aktivierung derselben die geschädigten Myelinscheiden wieder hergestellt würden. Zur symptomorientierten Therapie bzw. Rehabilitation gehören zum Beispiel physio- beziehungsweise ergotherapeutische Betreuung, Hilfsmittelverordnung (Gehhilfen, Rollstuhl) und psychologische und soziale Hilfestellung.

1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) - Tiermodell

Schon 1947 injizierten Kabat et al. heterologe Hirngewebe zusammen mit Adjuvantien und induzierten dadurch eine akute disseminierte Enzephalomyelitis in Rhesusaffen (23). In Mäusen war die EAE zunächst durch niedrige Krankheitsinzidenz und sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe in ihrer Aussagekraft limitiert. Die Induktion konnte mit Hilfe der Stimulation mit Pertussistoxin und der Entdeckung empfänglicherer Mausstämme entscheidend gesteigert werden. Heute kann die EAE aktiv mittels Myelinantigen oder passiv durch den Transfer aktivierter Myelin spezifischer T-Zellen induziert werden. Weitere Ausführungen und die genauen Immunisierungsprotokolle finden sich in 2.2.7. Beide Protokolle haben gemeinsam, dass die aktivierten myelinspezifischen CD4+ T-Zellen die BHS überwinden, dort reaktiviert werden (24) und mittels Chemokinen Makrophagen rekrutieren, die dann wiederum vor allem mit Hilfe pro-inflammatorischer Mediatoren eine Entzündung und Gewebeschäden auslösen (25). Die Läsionen sind durch primäre Demyelinisierung und durch generellen Gewebeschaden mit axonalem und neuronalem Schaden charakterisiert, der von T-Zellen und aktivierten Makrophagen begleitet wird (26).

In den meisten Nagern entwickelt sich die klassische EAE als aufsteigende Lähmung, beginnend mit einer Lähmung des Schwanzes, gefolgt von den Hinterläufen und letzen Endes auch der Vorderläufe (2), die in einen klinischen Score zwischen 0 (keine Symptome) und 5 (moribund) eingeordnet wird. In den verschiedenen Mausstämmen zum Beispiel entwickeln sich aber unterschiedliche Verlaufsformen der EAE, ähnlich den verschiedenen Verlaufsformen der MS.

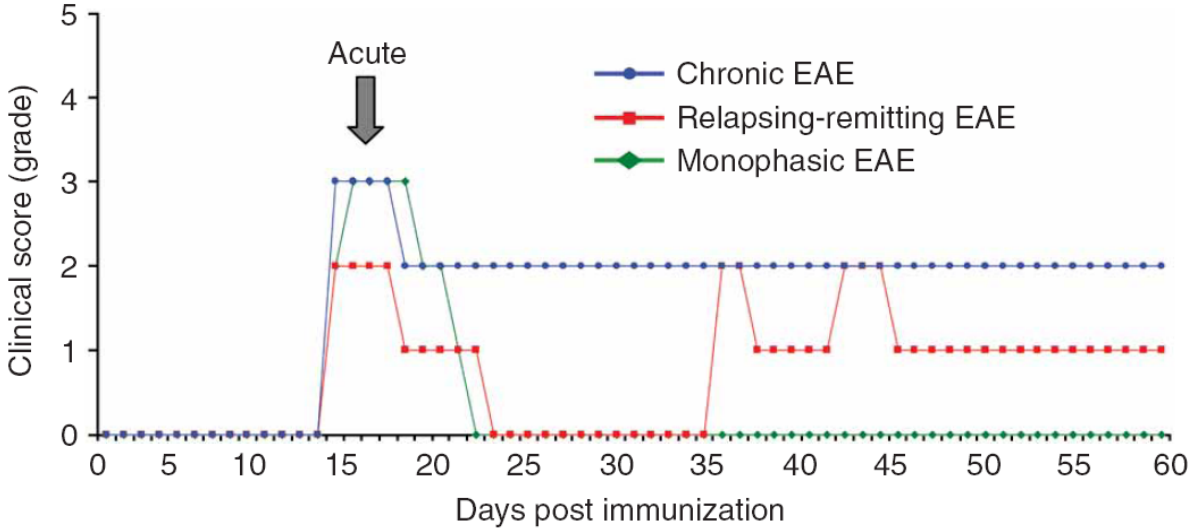


Abbildung 2: Klinische Verläufe der klassischen EAE. *Der klinische Score rangiert zwischen 0 (keine Klinik) und 5 (moribund). Es wird zwischen chronischer EAE (blau), schubförmig remittierendem Verlauf (rot) und monophasischer EAE (grün) unterschieden. Abbildung aus Stromnes 2006 (2); Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Protocols, Figure 1a, 2006*

Wie in Abbildung 2 zu sehen gibt es eine chronische Verlaufsform, in der sich die Mäuse nach einer akuten Anfangsphase mit einem höheren klinischen Score und entsprechenden Restsymptomen stabilisieren. Diese chronische Verlaufsform der EAE findet sich meistens im C57BL/6 Mausstamm, wenn mittels MOG35-55 (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein) Peptid immunisiert wird, während die schubförmig remittierende Verlaufsform mit völliger Symptomfreiheit im Intervall vor allem mittels PLP139-151 (Proteolipoprotein) induziert im SJL Mausstamm zu finden ist. Generell kann der Verlauf der Krankheit in eine akute Phase (erstes Erscheinen klinischer Symptome der aufsteigenden Lähmung), eine Phase der Remission (klinische Besserung mindestens für zwei Tage mit einer Reduktion des Scores) und eine eventuell folgende Rezidivphase (Ansteigen des klinischen Scores um mindestens eins für mindestens zwei Tage nach einer Remissionsphase) unterteilt werden.

Sowohl die EAE als auch die MS sind durch fokale Demyelinisierung und entzündliche Infiltrate charakterisiert, die aus T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen bestehen (2).
In der EAE sind die Entzündungsherde allerdings hauptsächlich im Rückenmark und Kleinhirn zu finden, wie auch die Klinik der aufsteigenden Lähmung der klassischen EAE reflektiert. In der MS hingegen sind die Herde ebenso häufig auch im Großhirn zu finden. Der

genaue Mechanismus dieser unterschiedlichen Lokalisationen ist bis heute nicht verstanden, wenn auch atypische EAE Verläufe mit vermehrten Herden im Großhirn beschrieben wurden (27). Des Weiteren wird das gängige EAE-Modell durch Myelinantigene aktiv induziert, sie kann also nicht genutzt werden, um die auslösenden Faktoren der spontan auftretenden MS zu erforschen. Außerdem sind verschiedene posttranslationale Modifizierungen der Myelinproteine wie die Citrullinierung oder Azylierung verschiedener Reste des Myelin Basischen Proteins (MBP) bei den synthetisch hergestellten Myelinproteinen, die zur Induktion der EAE genutzt werden, nicht vorhanden (28). Überdies werden durch die Induktion mittels Antigen in Kombination mit Adjuvantien hauptsächlich die MHC II abhängigen CD4+ T-Zellen stimuliert und nicht die MHC I abhängigen CD8+ T-Zellen, die aber einen relevanten Anteil der entzündlichen Infiltrate in MS Läsionen ausmachen (29). Des Weiteren muss beachtet werden, dass es in manchen Mausstämmen wie zum Beispiel in der MOG-induzierten EAE im C57BL/6 Mausstamm keine demyelinisierende Autoantikörperantwort gibt (30). Somit scheint genetische Variabilität die Pathogenese zu beeinflussen.

1.3 Sirt1, eine Histondeazetylase der Gruppe III

Die Erbinformationen des Menschen sind auf der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert. Die DNA liegt allerdings nicht frei im Zellkern vor, sondern 146 Basenpaare (bp) DNA sind in einem sogenannten Nucleosom als linksgedrehte Helix um ein Histonoktamer gewickelt. Dieses Histonoktamer bildet sich durch die Heterodimerisierung der Histonproteine H3 und H4, die sich mit einem weiteren Dimer zu einem (H3, H4)2-Tetramer zusammenlagern. Die Histone H2A und H2B bilden ebenfalls ein Heterodimer, von denen sich je eines an den Seiten des Tetramers anlagert (31;32).

Das so entstandene Histonoktamer ist auf Grund der zahlreichen Arginin- und Lysinreste stark basisch und somit positiv geladen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen haftet die negativ geladene DNA an dem Histonoktamer. N-Terminal befindet sich die sogenannte „Schwanzregion“ der einzelnen Histonproteine, in der reversible Modifikationen verschiedener Aminosäuren zur Initiation der Transkription der gespeicherten Gene führen können. Diese Modifikationen sind vor allem Azetylierung/Deazetylierung von Lysinresten, Phosphorylierung/ Dephosphorylierung von Serinresten, Methylierung von Lysin- oder Argininresten und Ubiquitinylierung (33-35). Azetyliert wird durch Sirt1 zum Beispiel H3K9 und H4K16, wobei H3K9 auch methyliert werden kann.

Vor allem durch die Azetylierung von Lysinresten werden positive Ladungen der Histonproteine entfernt, wodurch die Bindung zwischen Histonproteinen und DNA abnimmt, das Nukleosom sich auflockert und sich weitere Proteine anlagern können, die dann entweder zur Initiation der Transkription oder zu einem weiteren Auflockern führen (36). Im

Allgemeinen gilt Chromatin mit azetylierten Histonen als aktiv (Euchromatin), Deazetylierung ist mit einer Blockade der Transkription verbunden (Heterochromatin).
Die Initiation der Transkription wird wesentlich vom Azetylierungsgleichgewicht zwischen Histonazetyltransferasen (HAT) und Histondeazetylasen (HDAC) beeinflusst. Die HAT ersetzen eine positiv geladene Aminogruppe durch einen Azetylrest. Die HDAC entfernen diesen Azetylrest wieder und sorgen so für ein erneutes Anlagern der DNA an die Histonproteine. Die Klassifizierung der HDAC in vier Gruppen findet sich in Tabelle 2 und erfolgt anhand ihrer Homologie zu HDAC der Hefe, da es sich um hoch konservierte Proteine handelt.

Tabelle 2: Überblick der Klassen der Histondeazetylasen (HDAC)

Einteilung		Sacharomyces cervesiae	Metabolischer Kofaktor
Klasse I	HDAC 1 - 3, -8	RPD3 Gen	Zink Ion
Klasse II	HDAC 4 - 7, -9, -10	Hda1 Gen	Zink Ion
Klasse III	Sirt1 - 7	Sir2	NAD+
Klasse IV	HDAC 11		

HDAC liegen meist als Multienzymkomplexe vor und spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen und zelllinienspezifischen Vorläuferzellen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die HDAC Klasse III, im speziellen Sirt1. Die HDAC Klasse III werden nach Sir2 *(silencing information regulator 2)* beziehungsweise dem humanen Korrelat Sirt1-7 *(silent mating type information regulation 2 homolog 1-7)* benannt. Sie finden sich in Bakterien, Hefen, Fliegen, Fischen, Nagern, Pflanzen und eben auch dem Menschen, was darauf schließen lässt, dass sie während der Evolution hoch konserviert wurden (37). Sie arbeiten mit Hilfe des Kofaktors Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD+), dessen Ribose die Azetylgruppe aufnimmt, wodurch 2´-O-Acetyl-ADP-Ribose und Nikotinamid sowie das deazetylierte Protein entstehen. Die Reaktion findet sich an Hand des Beispiels von Sirt1 in Abbildung 3.
Aus diesem Grund spielt das oxidative Niveau für die Funktion der Sirtuine eine große Rolle, da die Aktivität durch das NAD+/NADH Gleichgewicht reguliert wird.
Das Sirt1-Protein besteht aus 747 Aminosäuren und steuert den Energiehaushalt, die Zellalterung, die Stressreaktion und die DNA-Reparation. Es findet sich vorwiegend im Nukleus aber auch im Zytosol der Zelle, da nukleare Export-Sequenzen (NES) in dem N-terminalen Ausläufer des Sirt1 für den nukleo-zytoplasmatischen Austausch sorgen, wodurch die Fähigkeit bedingt ist, mit verschiedenen Substraten zu reagieren (38).

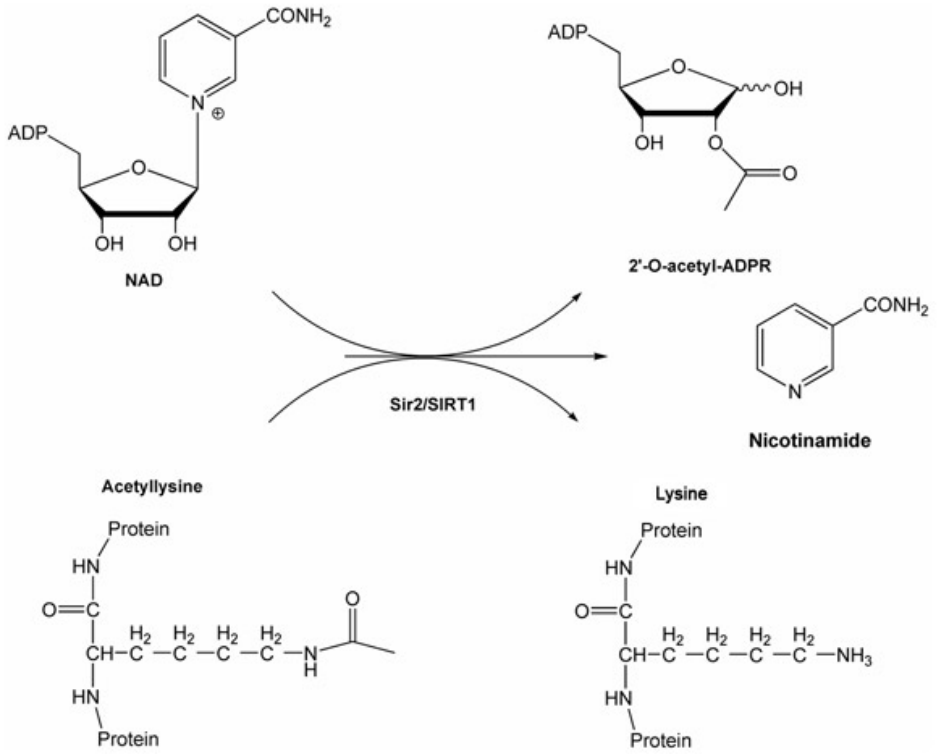


Abbildung 3: Die Sirt1 Reaktion. *Die Azetylgruppe eines azetylierten Proteins wird auf die ADP-Ribose eines NAD+ übertragen. Dadurch entsteht Nikotinamid, 2´-O-azetyl-ADP-Ribose und ein deazetyliertes Protein. Abbildung aus Yang 2006(1). Mit freundlicher Genehmigung der „Springer Science and Business Media“*

Nach der anfänglichen Klassifizierung als allgemeine HDAC, ist mittlerweile geklärt, dass Sirt1 spezifisch H3K9ac, H3K14ac, H4K16ac und H1K26ac deazetylieren kann (39). Generell muss betont werden, dass die vielfältigen Fähigkeiten des Sirt1 nicht nur auf Histondeazetylierung zurückzuführen sind, sondern zahlreiche Proteine deazetyliert werden können und das Sirt1-Protein als solches auch nur durch Komplexbildung ohne enzymatische Reaktion Wirkung zeigen kann.

Durch das Azetylierungsgleichgewicht zwischen Histonazetyltransferasen (HAT) und Histondeazetylasen (HDAC) wird die Schwelle zwischen Stressresistenz und Apoptose der Zelle reguliert. Einerseits wirkt Sirt1 durch Deazetylierung von p53 der p53-induzierten Apoptose bei oxidativem Stress entgegen (40-42). Außerdem ergibt sich durch die Interaktion von Sirt1 mit zum Beispiel den Stress-vermittelnden Transkriptionsfaktoren *forkhead transcription factors* (FOXOs), die durch Sirt1 deacetyliert werden, eine vermehrte Stress-Resistenz mit verstärkter DNA Reparatur, Zellzyklusarrest und blockierter Apoptose. (43) Deshalb war Sirt1 initial als Tumorpromotor betrachtet worden. Andererseits wirkt Sirt1 bei massiver Zellschädigung proapoptotisch, indem das zytoplasmatische Sirt1 durch Deacetylierung von p53 die Translokation desselben in den Nukleus verhindert und Apoptose via Cytochrom C ausgelöst wird (42). So kann Sirt1 bei verschiedenen Tumorarten ebenfalls als Tumorsuppressor fungieren (43-45). Fehlregulationen in diesem System können die Tumorgenese begünstigen.

So ist wahrscheinlich, dass die Rolle des Sirt1 in der Tumorgenese durch multiple Faktoren beeinflusst wird, in verschiedenen Tumorarten durchaus unterschiedlich sein kann und Sirt1 selbst durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wird. In dieser Hinsicht ist bekannt, dass Sirt1 wie auch weitere Sirtuine an Serin- und Threonin- beziehungsweise Tyrosinresten (Sirt6) phosphoryliert werden können. Außerdem können sowohl Lysinreste von Sirt1 methyliert und sumoyliert als auch Cysteinreste nitrosyliert werden (46). So ist bekannt, dass Sirt1 in vielen Krebszellen überexprimiert und gleichzeitig selbst von Tumorsuppressoren reguliert wird. So unterdrücken zwei p53 Bindungsstellen im Sirt1-Promotor normalerweise die Sirt1 Expression (43), und der Tumorsuppressor E2F1 bindet ebenfalls an den Sirt1-Promotor und reguliert sowohl die basale Expression als auch die Induktion von Sirt1 nach DNA-Schädigung (47). Das Tumorsuppressorgen *hypermethylated in cancer* (HIC1) unterdrückt ebenfalls die Sirt1-Expression (48).

Eine geringe Überexpression des Sirt1 Gens führte zu einer um 30 Prozent verlängerten Lebensspanne von Hefezellen (49). 70 Prozent Verlängerung waren bei Aktivierung von Sirt1 durch Resveratrol möglich (50). Experimente in der Fruchtfliege unterstützten diese Beobachtungen (51). Hungerversuche führten zu eben solchen verlängerten Lebensspannen, da NAD+ durch Hungern induziert und Nikotinamid reduziert wird, was beides die Aktivität von Sirt1 steigert. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Sirt1 Aktivität beziehungsweise Quantität eine genomische Stabilität auch in Nagern induziert und so die Tumorgenese beziehungsweise altersabhängige Veränderungen der Transkription unterdrücken kann (52). Allerdings konnte in humanen Fibroblasten und Epithelzellen der Prostata keine Verlängerung der replikativen Lebensspanne festgestellt werden (53). Während oxidativen Stresses zeigte sich ebenso wie im Alter auf Grund des entstandenen DNA Schadens eine vollkommene Umverteilung des Sirt1 entlang des Genoms (unter zehn Prozent blieben gleich) mit gleichzeitiger Derepression der vorher durch Sirt1 unterdrückten Gene (52).
Ein weiteres von Sirt1 deazetyliertes Protein ist der *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-κB), der in die Expression proinflammatorischer Zytokine involviert ist, durch Sirt1 unterdrückt wird und so zu einem neuroprotektiven Effekt führen kann (54). Außerdem bindet Sirt1 an die bHLH-Domäne des Transkriptionsfaktors der *basic helix-loop-helix* Familie Hes1 (55) und unterdrückt einen Schlüsselregulator der Lipogenese, das *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR-γ) (56). Zusätzlich reduziert eine gesteigerte Sirt1-Expression die Ablagerung von β-Amyloid der Alzheimer Erkrankung (57) und schützt vor Neuro- und axonaler Degeneration (58;59). Sirt1 inhibiert zum Beispiel aber auch die Differenzierung von Muskelzellen. Wie das Sirt1 Protein letztendlich seine

Substrate erkennt ist nicht bekannt. Die Erkennung scheint nicht auf der Aminosäuresequenz vor dem azetylierten Lysin zu beruhen (60), sondern komplexer zu sein.

1.3.1 Sirt1 Lokalisation im adulten ZNS

Das adulte Gehirn hat neben dem Skelettmuskel, Herzen und den Nieren die höchste Sirt1 mRNA Expression aller Gewebe (53). Über die spezifische Lokalisation von Sirt1 im ZNS ist recht wenig bekannt, außer dass die Expression ubiquitär ist (61). In gesunden adulten Mäusen konnte eine ausführliche Studie mit Hilfe der *in situ hybridization histochemistry* (ISHH) zeigen, dass Sirt1 mRNA im adulten Mausgehirn weit verbreitet ist. Die höchsten Spiegel zeigten hier einerseits metabolisch relevante Areale wie sowohl der Nukleus paraventricularis, ventromedialis, dorsomedialis und arcuatus als auch die Area postrema und der Nukleus solitarius. Andererseits zeigten besonders die Hippocampusformation und das Kleinhirn eine sehr intensive Hybridisierung (62). In der Immunhistochemie von adulten Mäusen fand sich die höchste Expression von Sirt1 in der Nähe der Seitenventrikel in Nestin+ positiven Zellen (63). Unter oxidativen Bedingungen beziehungsweise in der EAE ist Sirt1 in der Immunhistochemie vermehrt in den inflammatorischen Gebieten ausgeprägt (5). Ebenso wird Sirt1 im Hungerstoffwechsel im Hypothalamus induziert (62).

1.3.2 Sirt1 in Vorläuferzellen des zentralen Nervensystem – Zelldifferenzierung

Milde oxidative Bedingungen oder direkte Aktivierung von Sirt1 führten zu einer Differenzierung von NVZ in Richtung Astrozyten unter Abnahme der Entwicklung von Neuronen. Es konnte gezeigt werden, dass Sirt1 an Hes1 gebunden war und so das proneuronale Mash1 unterdrückt (5). Andererseits wurde im Zytoplasma embryonaler NVZ Sirt1 gefunden, das zu Beginn der Differenzierung in entsprechendem Medium in den Nucleus der Zelle transloziert, Hes1 inhibiert und so die neurale Differenzierung fördert (63).

1.3.3 Sirt1 und entzündliche Prozesse im ZNS, speziell EAE

Bei verschiedenen neurologischen Krankheiten generieren entzündliche Prozesse ein oxidatives Milieu und inhibieren so die Neurogenese im ZNS (64;65). Es ist bekannt, dass Sirt1 während eines demyelinisierenden Prozesses in perivaskulären Gebieten mit typischen leukozytären Infiltrationen und reaktiver Astrogliose in Astrozyten induziert wird (5). Entsprechend findet sich auch eine vermehrte Sirt1-Expression in NVZ, die pro-oxidativen Bedingungen ausgesetzt waren.

Viele Arbeiten, die systemische Sirt1-Aktivatoren in entzündlichen Erkrankungen im ZNS eingesetzt haben, zeigten eine Verbesserung der klinischen Symptome und weniger ausgeprägte entzündliche Veränderungen im Gewebe (66). So zeigten Resveratrol/SRT 501-(Variante des Resveratrols) behandelte Mäuse geringere neurologische Defizite in der

Remissionsphase der EAE (67;68);(69) und auch mit retardierter Nikotinsäure gefütterte Mäuse erholten sich schneller und zeigten weniger entzündliche Infiltrate (70). Nikotinsäure fungiert als ein Ausgangsstoff des NAD+ und durch orale Zugabe kann der NAD Spiegel gesteigert werden (71). Da dieses als Substrat der Sirt1 Reaktion fungiert, kann diese gesteigert ablaufen. Gleiches gilt bei direkter oraler Substitution von NAD+ (72). Es ist bekannt, dass NAD+ Spiegel im ZNS während der EAE normalerweise sinken, möglicherweise durch den verstärkten Verbrauch der NAD+ abhängigen Enzyme wie Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) oder eben auch Sirtuine (73).
Im Gegensatz dazu zeigen aktuelle Arbeiten, dass Tiere mit selektivem Sirt1 Funktionsverlust im Gehirn vermehrte Remyelinisierung und einen verzögerten klinischen Krankheitsbeginn in der EAE aufweisen (6).

1.4 Sirtuine – eine homogene Gruppe?

Sirtuine haben nicht nur jeweils eigenständige Wirkungsbereiche, sondern zeigen an vielen Stellen eine sich gegenseitig beeinflussende Funktion (66;74). Eine Übersicht gibt Tabelle 3. Dennoch werden im Folgenden die Sirtuine der Übersicht halber einzeln vorgestellt.

Tabelle 3: Überblick über die Gruppe der Sirtuine 1-7 *in Anlehnung an Haigis 2006 (75). DA = Deazetylase-Aktivität, ART= ADP-Ribosyl-Transferase-Aktivität (Frye 1999)*

	intrazelluläre Lokalisation	Co faktor	Hauptaufgaben	Form	knockout Mäuse
Sirt1	Nukleus, Zytosol	NAD+	Zellalterung Metabolismus DNA Reparatur	DA (ART)	postnatal tödlich bzw. bedingt lebensfähig bei unterschiedlichem genetischen Hintergrund
Sirt2	Zytosol, Nukleus	NAD+	Zellzyklus Adipozyten-Differenzierung	DA (ART)	
Sirt3	Mitochondrien	NAD+	Thermogenese Metabolismus	DA	vermehrte Tumoren
Sirt4	Mitochondrien	NAD+	Insulin Sekretion Metabolismus	ART	kein offensichtlich veränderter Phänotyp
Sirt5	Mitochondrien	NAD+	?	DA	kein offensichtlich veränderter Phänotyp
Sirt6	Nukleus	NAD+	Glukosestoffwechsel DNA Reparatur	ART	postnatal tödlich, schnelle Alterung
Sirt7	Nukleolus	NAD+ (?)	DNA Transkription Herzfunktion		verkürzte Lebensspanne, Kardiomyopathie

1.4.1 Sirt2

Bislang vorliegenden Erkenntnissen nach ist Sirt2 als einziges Sirtuin hauptsächlich im Zytoplasma und nur zu einem geringen Anteil im Zellkern lokalisiert (53;76). Sirt1 wechselt während der Mitose in den Zellkern, um als Wächterprotein bei mitotischem Stress den Teilungsvorgang zu verhindern. Es würde dann nicht H4K16 deazetylieren und es käme nicht zu einer Kondensation des Chromatins (77-79).

Sirt2 zeigt ein gesteigertes Vorkommen im Gehirn und ist dort nicht in Neuronen, sondern in den Myelinmembranen und sowohl in adulten Oligodendrozyten als auch als früher Differenzierungsmarker in Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ) zu finden (80). Sirt2 deazetyliert vor allem auch das Lysin 40 des α-Tubulins (76;81;82). Interessanterweise wurde in OVZ mit ausgeschalteter Sirt2 Funktion *in vitro* eine verminderte α-Tubulin Deazetylierung beobachtet, verbunden mit einer Differenzierung der Zellen in ein reiferes Stadium (81). Gleichsinnig dazu kam es bei Überexpression zu verringerter morphologischer Differenzierung (81). Dies ist eigentlich eine paradoxe Beobachtung, da Sirt2 ja α-Tubulin deazetyliert und deshalb nicht gleichsinnig mit der Tubulin Azetylierung ansteigen sollte. Als Erklärung wird angenommen, dass Sirt2 benötigt wird um die ansteigende Menge an azetyliertem Tubulin zu kontrollieren und so den Zeitpunkt der Oligodendrozyten-differenzierung mit zu bestimmen (81;82).

1.4.2 Die mitochondrialen Sirtuine: Sirt3, Sirt4 und Sirt5

Alle mitochondrialen Sirtuine zeigen im Gehirn eine starke Expression, in etwa vergleichbar beziehungsweise größer als die in der Leber, Hoden oder Lunge. Jedoch ist über die mögliche spezielle Funktion von mitochondrialen Sirtuinen im Gehirn wenig bekannt. Die Mitochondrien sind die Produzenten der *reactive oxygen species* (ROS) und mitochondriale Dysfunktion ist mit Alterung und diversen Krankheiten, wie Krebs, neurodegenerativen Erkrankungen und Diabetes vergesellschaftet (83). So könnten diese drei redoxsensitiven, NAD+ abhängigen Sirtuine oxidativen Stress regulieren und wären auf diese Weise mit der Zellalterung verbunden.

Sirt3 agiert mit dem Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien und deazetyliert die mitochondriale Azetyl-CoA Synthetase, wodurch diese aktiviert wird und aus Azetat, CoA und ATP Azetyl-CoA herstellt (43;75). Außerdem ist Sirt3 im braunen Fettgewebe vorhanden und wird dort durch Kälte indiziert (84).

Sirt4 besitzt keine Deazetylasefunktion, sondern hat eine ADP-Ribosyl-Transferase-Aktivität (76). Die wichtigste bekannte Funktion ist die Inhibierung der Glutamat Dehydrogenase, die in den Mitochondrien Glutamat zu α–Ketoglutarat umwandelt (43;75;85). Von Sirt5 ist wenig mehr bekannt, als dass es eine schwache Deazetylasefunktion besitzt (76).

1.4.3 Sirt6

Sirt6 ist hauptsächlich Chromatin-assoziiert im Nukleus exprimiert. Studien an Sirt6-defizienten Mäusen zeigten, dass diese mit normalem Phänotyp auf die Welt kommen, dann aber innerhalb von drei Wochen altern. Dies zeigte sich durch Lordokyphosen, Abbau des subkutanen Fettmantels, verminderte Knochendichte, Lymphopenien, metabolische Defekte und eine verkürzte Lebensdauer von nur ungefähr vier Wochen (86). Als zu Grunde liegender Mechanismus wird eine Deazetylierung des Histons H3 Lysin 9 (H3K9) an Promotorregionen von NF-kappaB Zielgenen angenommen. Dadurch wird die Wirkung von NF-kappaB herunter reguliert, das normalerweise Genexpression, Apoptose und zelluläre Seneszenz (Alterung) vermittelt (87). Auffällig ist, dass eine bestimmte Form der DNA Reparatur, die Basen Exzisions Reparatur (BER) gestört ist, wodurch es zu genomischer Instabilität kommt (86). Zu beachten ist allerdings, dass *in vitro* nur eine schwache Deazetylase-Aktivität beobachtet wurde (76), dahingegen eine deutliche auto ADP-Ribosyl-Transferase Aktivität (88).

Wird Sirt6 nicht überall, sondern nur neuronal ausgeschaltet, zeigt sich eine postnatale Wachstumsretardierung durch ein niedriges Wachstumshormon- (GH) und *Insulin-like growth* Faktor 1- (IGF 1) Level. Die Mäuse sterben nicht, sondern werden adipös. H3K9 und H3K56 werden in der Abwesenheit von Sirt6 in verschiedenen Gehirnregionen einschließlich der Orte der neuroendokrinen Regulation hyperazetyliert (89). Demnach spielt Sirt6 auch eine wichtige Rolle bei metabolischen Prozessen.

1.4.4 Sirt7

Sirt7 ist vor allem im Nukleolus vorhanden und interagiert dort mit der RNA Polymerase I (Pol I) in der Form, dass die durch Pol I vermittelte Transkription von Genen bei Überexpression von Sirt7 verstärkt und in knockout Tieren vermindert wird (90).

Sirt7-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Lebenserwartung, eine Herzhypertrophie und eine entzündliche Kardiomyopathie. *In vitro* haben diese primären Kardiomyozyten eine verminderte Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Immunhistologisch sind Sirt7-defiziente Herzen vermehrt von Immunzellen, vor allem Granulozyten, infiltriert (91).

1.5 Oligodendrozytenlinie – von NVZ zu reifen Oligodendrozyten

Reife Oligodendrozyten sind die Myelin produzierenden Zellen des ZNS, wodurch eine schnelle Weiterleitung der elektrischen Aktionspotentiale, die sogenannte saltatorische Erregungsleitung mit bis zu über 100m/s möglich wird. Ein Oligodendrozyt kann mit seinen Fortsätzen bis zu 40 Myelinsegmente (Internodien) auf verschiedenen Axonen bilden (92). Da die Myelinscheiden ständig erneuert werden, bildet ein Oligodendrozyt 5 – 50 000 µm² Membran pro Tag (93). Einerseits sind die Oligodendrozytenfortsätze für die Nährstoffversorgung der umgebenen Axone zuständig und generieren Signale durch Wachstumsfaktoren und die Verteilung der axonalen Proteine, andererseits werden die Oligodendrozyten durch Wachstumsfaktoren und elektrische Aktivität der Neuronen reguliert.

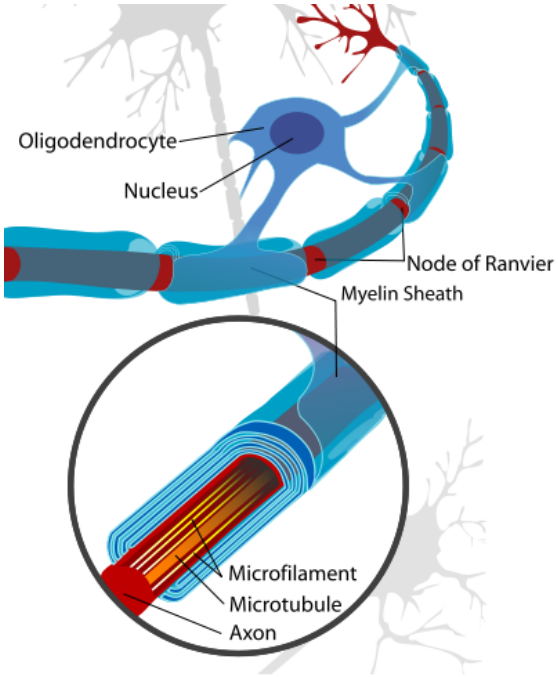


***Abbildung 4: reifer Oligodendrozyt mit* schematischer Myelinisierung**, aus: Wikimedia Commons, Neuron_with_oligodendrocyte_and_myelin_sheath.svg; 2010-07-14 17:24 (UTC)

Wichtig ist, dass sich reife Oligodendrozyten in der postmitotischen Phase befinden und so unfähig zur Migration und Remyelinisierung sind. Auf der anderen Seite sind im erwachsenen Gehirn fünf bis acht Prozent aller Gliazellen Vorläuferzellen der Oligodendrozyten, die sogenannten OVZ (oder OPC = *Oligodendrocyte Progenitor Cell*) (94). Diese bipolaren Zellen sind über das ganze ZNS verteilt, können sich teilen (Selbsterneuerung), sich fortbewegen und wie perinatale Vorläuferzellen der Oligodendrozyten *in vitro* zu Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren (relative Multipotenzialität). Eine andere Quelle der neu generierten Oligodendrozyten ist die subventrikuläre Zone (95). Wenn es zu einer Schädigung des Gehirns kommt, sei es durch Toxizität, Sauerstoffmangel oder eben auch Entzündung wie bei der EAE und der MS, entwickeln OVZ ein hohes Proliferationspotential und reagieren dementsprechend schnell auf die Schädigung (92;96). Obwohl einige MS-Patienten eine erstaunlich hohe Remyelinisierungsrate zeigen, haben die meisten MS-Patienten eine insuffiziente Remyelinisierung, wodurch die freiliegenden Axone weiter geschädigt werden. Warum die Remyelinisierung in diesen Fällen fehlschlägt, ist nicht endgültig geklärt. Die Hypothesen reichen von einer Erschöpfung der OVZ Quelle über eine unüberwindbare Glianarbe bis hin zur Schädigung der OVZ und des neu generierten Myelin selbst.

OVZ exprimieren das GT3 Gangliosid A2B5, den *platelet-derived growth factor receptor α subunit* (PDGFRα) und das Proteoglykan NG2, wodurch OVZ z.B. in einer immunhistologischen Färbung identifiziert werden können (93). Es können embryologische beziehungsweise perinatale von adulten OVZ unterschieden werden (97). Die adulten OVZ zeigen eine geringere Beweglichkeit, einen verzögerten Zellzyklus und geringeres Überleben verglichen mit den perinatalen OVZ.

1.5.1 Übersicht über Spezifizierung und Differenzierung – Meilensteine der Oligodendrozytenentwicklung

Die für diese Arbeit relevanten Marker, die auch in der Immunhistochemie genutzt wurden, werden in Abbildung 5 dargestellt.

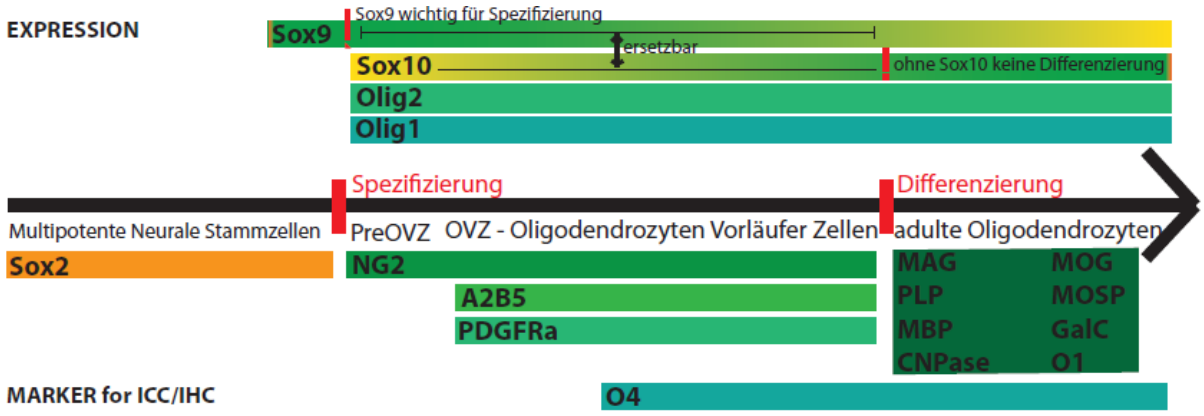


Abbildung 5: *Übersicht über die Marker im Rahmen der* ***Oligodendrozytenentwicklung***

Der Übergang von den multipotenten neuralen Stammzellen zu den eigentlichen OVZ wird Spezifizierung genannt und ist vor allem durch bestimmte Histon-Modifikationen charakterisiert. So ist dieser Übergang durch einen Verlust des *high-mobility-group* (HMG) Transkriptionsregulators Sox2 und eine Inhibition neuronaler und astrozytärer Gene in Verbindung mit einer zunehmenden Aktivität von HDAC der Klassen I und II gekennzeichnet (98;99). Da ebenfalls gezeigt werden konnte, dass aus OVZ bei experimenteller Inhibition der HDAC der Klassen I und II auch wieder Astrozyten und Neurone entstehen können beziehungsweise Sox2 wieder exprimiert wird (100;101), scheinen diese Gene eine essentielle Bedingung für die Identität von OVZ/ Oligodendrozyten zu sein (98;102). Der HMG Transkriptionsregulator Sox9 scheint ebenfalls sehr wichtig für die Spezifizierung zu sein, da sich bei einem Sox9 Mangel in neuralen Stammzellen (CRE/loxP) im Rückenmark sehr viel weniger OVZ bilden (103).

Der Übergang von den OVZ zu den eigentlichen unreifen beziehungsweise reifen Oligodendrozyten wird Differenzierung genannt. Dieser Prozess ist wiederum durch Histonmodifizierungen gekennzeichnet, da zunächst die Inhibitoren der Transkription

schwächer werden, dann Aktivatoren gesteigert exprimiert werden und schlussendlich eine Expression der Gene des Myelins erfolgt (98;102). ID2, ID4 und Hes5 sind solche Transkriptionsinhibitoren, die in OVZ stark ausgeprägt sind und dann während der Differenzierung zu Myelin produzierenden Oligodendrozyten verschwinden (104;105). Die Transkriptionsinhibitoren ID2 und ID4 *inhibitor of differentiation of helix-loop-helix family* bilden zum Beispiel Komplexe mit den bHLH *basic helix-loop-helix* Faktoren Olig1 und Olig2, die für die Oligodendrozytenentwicklung nötig sind, und sorgen so für eine Blockierung der Entwicklung (106).

Es ist bekannt, dass HDAC1 und HDAC2 für die gezielte Differenzierung von Oligodendrozyten notwendig sind, da Mäuse, in denen beide Gene in Oligodendrozyten ausgeschaltet sind, keine Entwicklung von den Oligodendrozyten-spezifischen Markern Olig2 oder MBP im Rückenmark zeigen (99). Bei der Differenzierung von OVZ zu myelinisierenden Oligodendrozyten *in vitro* wird ein Verlust von Azetylgruppen an Lysinresten der nukleosomalen Histone H3 und H4 beobachtet, was ebenfalls für eine Aktivierung von HDACs spricht (107). Ebenso führt eine Behandlung mit Trichostatin A (TSA), einem Inhibitor von HDAC der Klassen I und II, zu einem Arrest von OVZ in einem unreifen Stadium der Differenzierung mit fehlender Expression von Proteolipid-Protein 1 (PLP) und Galaktozerebrosidase (GalC) (107). Durch den Verlust an Transkriptionsinhibitoren während der Differenzierung werden im Gegenzug Aktivatoren der Oligodendrozytendifferenzierung/ -reifung gesteigert exprimiert. Dies sind unter anderem Mash1 und Sox10.

1.5.2 Sox10

Von dem *high-mobility-group* (HMG) Transkriptionsregulator Sox10 ist bekannt, dass er im ZNS ausschließlich von Zellen der Oligodendrozytenlinie exprimiert wird. Er wird von den OVZ zwar schon direkt nach der Spezifizierung exprimiert, ist vor allem aber der bestimmende Faktor der Induktion der Myelin Produktion während der Differenzierung (108). In Sox10-defizienten Mäusen zeigte sich ein erheblicher Verlust differenzierter und Myelin-produzierender Oligodendrozyten (109). Zwischen Spezifizierung und Differenzierung allerdings können sich Sox9 und Sox10 gegenseitig kompensieren, lediglich die Ausschaltung beider Gene führt zu einem völligen Fehlen des PDGF-Rezeptors α, wodurch vermutlich die beobachtete vermehrte Apoptose, verminderte Migration und Überleben der OVZ bei allerdings erhaltener Proliferation bedingt sind (110;111). Ebenso lässt sich eine gleichsinnige Regulation des *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) Gens durch Sox10 nachweisen (112), wodurch sich die erhaltene beziehungsweise gesteigerte Proliferation der OVZ erklären ließe, da CNTF auch unter physiologischen Umständen die Proliferation von OVZ induziert (113). Es wurde ein Olig1/Sox10 Komplex beschrieben, der die MBP Transkription über konservierte DNA Sequenzen im MBP Promotor aktiviert (114). In

Mäusen bindet Olig2 ebenfalls an einen bestimmten Enhancer des Sox10 und induziert so die differenzierende Funktion des Sox10 (115).

1.5.3 Mash1 (ASCL1)

Mash1 ist ein Transkriptionsfaktor der bHLH Familie, der wie oben beschrieben ebenfalls zu den Aktivatoren der Differenzierung der Oligodendrozyten gehört. Das zeitliche Expressionsmuster von Mash1 ist biphasisch; der erste Höhepunkt ist in der ventrikulären Zone während der ventralen Entwicklung, der zweite später während der Differenzierung der Oligodendrozyten (116). Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil der OVZ im embryonalen Gehirn aus Mash1+ positiven Vorläufern generiert wird und Mash1 dabei mit Olig2 kooperiert (117). Gleichzeitig ist Mash1 auch ein wichtiger proneuronaler Faktor, der die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen induziert. Unter oxidativen Bedingungen wie sie bei entzündlichen Veränderungen entstehen, wird das pro-neuronale Mash1 durch induziertes Sirt1 inhibiert, da dieses an Hes1 bindet (5). Auch in der postnatalen subventrikulären Zone (SVZ) ist Mash1 sowohl in neuronalen als auch Vorläuferzellen der Oligodendrozyten exprimiert (118).

1.5.4 Olig1 und Olig2

Olig1 und Olig2 sind Transkriptionsfaktoren der bHLH Familie, die eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung der Oligodendrozyten innehaben (119;120). Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass auch in postpartalen NVZ die Expression von Olig1 und Olig2 für die Entwicklung der Oligodendrozyten eine wichtige Rolle spielt (121). Bei Verletzungen des Gehirns konnte eine massive Akkumulation von Olig2 (nicht Olig1) im Bereich der Schädigung beobachtet werden, nach dessen Inhibition mittels retroviralen Vektoren vermehrt unreife Neurone generiert wurden (122). Dies spricht dafür, dass Olig2 nach einer Schädigung finale Schritte der Neurogenese unterdrücken kann.

1.5.5 NG2

Das NG2 Proteoglykan ist ein transmembranöses Protein Typ 1, das von verschiedenen Zelltypen im ZNS von juvenilen und adulten Mäusen exprimiert wird. Für diese Arbeit ist wichtig, dass NG2+ Zellen im gesunden adulten Gehirn Vorläuferzellen der Oligodendrozyten darstellen (123), die dann ausgereifte Oligodendrozyten generieren und sich selbst erneuern können. Diese sogenannten NG2-Zellen des adulten Gehirns sind außerdem alle PDGFRα positiv (124). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das Proteoglykan NG2 den Wachstumsfaktor PDGFα präsentiert (125). NG2+ Zellen generieren A2B5+ Zellen. A2B5+ ist *in vitro* ein Marker für bipotentiale O2-A Vorläuferzellen, aber A2B5 Immunoreaktivität ist *in vivo* nicht spezifisch für OVZ (126). NG2+ Zellen sind *in vitro* multipotent (127;128) und auch in EAE-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese

NG2+/PDGFR+ doppelt positiven Zellen im demyelinisierten Rückenmark vor allem neue Oligodendrozyten, aber auch sehr wenige GFAP+ Astrozyten (reaktive Gliose in EAE) und NeuN+ Neurone generieren konnten (129). Bei Hirnschäden unterschiedlicher Ursache wie autoimmune Prozesse, hypoxische oder traumatische Schädigung werden Astrozyten, Makrophagen/Mikroglia und vor allem OVZ aktiviert. Hierdurch wird NG2 induziert, das axonales Wachstum zu verhindern scheint (130-132). Fast alle NG2+ Zellen sind auch positiv für Olig2 und Sox10 (133).

1.5.6 PDGFRα

Dieses Protein ist ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Der *platelet-derived growth factor* (PDGF) unterstützt die Teilung und Motilität von O-2A Vorläuferzellen im Sehnerv der Ratte, wohingegen es die verfrühte Differenzierung verhindert (134;135).
Die zentrale Rolle von PDGFRα in der Entwicklung von Oligodendrozyten wird an PDGFRα-defizienten Mäusen deutlich, die nur eine geringe Anzahl von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und reifen Oligodendrozyten besitzen und phänotypisch einen Tremor aufweisen (136). Am stärksten war diese Reduktion im Rückenmark und im Kleinhirn nachweisbar; damit an Orten, an denen auch bei der EAE vornehmlich Läsionen entstehen. Eine Überexpression von PDGFRα führt dagegen zu einer vermehrten Produktion von OVZ und auch differenzierteren Oligodendrozyten. Diese erleiden dann allerdings in einem noch nicht voll ausgereiften Stadium einen programmierten Zelltod, sodass die endgültige Anzahl der ausgereiften Oligodendrozyten völlig normal ist (137). Der PDGFRα kann in der Immunhistochemie (IHC) mit einem Antikörper (anti-PDGFRα) nachgewiesen werden und kennzeichnet so OVZ.

1.5.7 Marker der reifen Oligodendrozyten – MBP, CNPase, GalC und O4

Das *myelin basic protein* (MBP) ist einer der Hauptbestandteile des Myelins im ZNS und wird von Oligodendrozyten synthetisiert. In der Genese der MS wird eine Beteiligung von Antikörpern gegen Myelinantigene wie zum Beispiel MBP diskutiert (12). Das MBP kann in der IHC als Marker für Myelin-produzierende Zellen genutzt werden. Der Nachweis von MBP-mRNA kann als Marker der Differenzierung dienen, da die Expression der Myelingene erst nach der Differenzierung zu reifen Oligodendrozyten induziert wird (98;138).
CNPase (Zyklische Nukleotid Phosphodiesterase) ist ein Enzym, das vier Prozent des Myelins im ZNS ausmacht und nur von Oligodendrozyten produziert wird. Es scheint außerdem eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Oligodendrozyten zu spielen (139). Es kann demnach in der IHC als Marker für reife Oligodendrozyten genutzt werden, wenngleich die primäre Expression im Myelin eine genaue Lokalisation der zugehörigen Zelle erschwert.

Das Enzym des Gens GalC (Galaktozerebrosidase) ist ebenfalls ein Marker des Myelins in adulten Oligodendrozyten (140). Der Marker O1 reagiert mit GalC und markiert so ebenfalls differenzierte Oligodendrozyten.
Im Gegensatz dazu reagiert O4 mit einem Glykolipid Antigen namens POA (Pro-Oligodendrozyt Antigen), das bereits in späten OVZ gebildet wird. Ebenfalls markiert O4 reife Oligodendrozyten, in dem es auch an GalC bindet. MRF (Myelin-Gen-Regulationsfaktor) ist ein Transkriptionsregulator, der spezifisch von postmitotischen Oligodendrozyten im Nukleus exprimiert wird (141).

1.5.8 Weitere genutzte Marker für Zellfunktionen

p16INK4a - Tumorsupppressor
P16Ink4A, auch *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A) beziehungsweise *multiple tumor suppressor 1* (MTS-1) ist ein Tumorsuppressorprotein, das in gealterten Zellen akkumuliert und als Biomarker der Zellalterung genutzt werden kann (142);(143).

p21 - Zellzyklusinhibitor
Dieser Inhibitor Zyklin abhängiger Kinasen spielt eine sehr wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Während eine Induktion von p21 zum Zellzyklusarrest führt, kommt es bei Hemmung von p21 zu verschiedenen Effekten. Zum Beispiel unterdrücken viele Onkogene p21, um das Zellwachstum zu unterstützen. In qRT-PCR Analysen kann p21 gut als Marker für erhöhte Teilungsraten genutzt werde, da er hauptsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert wird (144).

p27kip1 – Zellzyklusinhibitor
P27kip1 verlängert die G1 Phase im Zellzyklus, in dem es an die *cdk* (*cell cycle-dependent kinase*) bindet. Erhöhte Aktivität von p27kip1 führt demnach zu einem Zellzyklusarrest, wohingegen ein Verlust der Funktion zu vermehrter Proliferation vor allem von C und A Zellen in der subventralen Zone (SVZ) führt (145).

p19ink4d - Zellzyklusinhibitor
P19ink4d ist auch ein Inhibitor der *cdk* (*cell cycle-dependent kinase*). Er wird in der subventralen Zone allerdings nur wenig exprimiert und kommt eher im RMS (*Rostral migratory stream*) vor.

Hes1
Hes1 ist ein Gewebe spezifischer bHLH (*basic helix-loop-helix*) Transkriptionsfaktor, dessen Regulation entscheidend ist für den Zeitpunkt der neuronalen Differenzierung. Durch ein

erhöhtes Level des Transkriptinsinhibitors ID2 bilden sich vermehrt Komplexe und die DNA Bindungskapazität des Hes1 wird herabgesetzt (238). Sirt1 bindet außerdem an Hes1 und inhibiert dadurch Mash1 (21).

PTEN

Die Phosphatase PTEN ist ein Tumorsuppressor, der als Bestandteil der Signaltransduktion die Apotose einleiten kann.

1.6 Keimzellregionen des zentralen Nervensystems der Maus

1.6.1 Subventrikuläre Zone (SVZ)

Eine wichtige Keimzellregion des adulten Gehirns sowohl der Nager als auch der Menschen ist die SVZ. Ursprünglich ist sie als zwei-Zellkern-breite Schicht unterhalb des Ependymzellen lateral der Seitenventrikel definiert worden (Abbildung 6). Mittlerweile ist bekannt, dass auch die SVZ anderer Ventrikel als Keimzellregion fungieren kann. Die Stammzellen der SVZ können über spezifische Vorläuferzellen sowohl zu Neuronen als auch zu Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten) differenzieren (146). In Abbildung 6 ist zu sehen, dass die SVZ zum Seitenventrikel hin durch Ependymzellen (grün, Nestin+/S100ß+) abgegrenzt wird. Diese sind nicht als Stammzellen definiert, da sie nur Gliazellen produzieren können (147;148). Es wird aber vermutet, dass sie über Zellkontakte für die Aufrechterhaltung des Mikromilieus und damit für die neurogenetische Nische verantwortlich sind (149). Die eigentlichen Stammzellen sind Astrozyten-ähnliche Zellen (Typ B Zelle, GFAP+/Nestin+/Sox2+), die durchwandernde Neuroblasten (Typ A Zelle, Dcx+) ummanteln und durch einzelne Zellausläufer Kontakt zum Ventrikelsystem haben. Es sind noch transiente Typ C Zellen (Mash1+, Olig2+, Sox2+) definiert worden, die sich rasch teilen und am Übergang zwischen den beiden Zellarten stehen (150).

1.6.2 Subgranulare Zone (SGZ)

Als weitere bereits seit langem charakterisierte Region mit adulter Neurogenese gilt die subgranulare Zone in der temporalen Hippocampusformation (151;152). Die SGZ ist 20 – 25 µm breit, circa drei Zellkernen entsprechend, und liegt im Übergang des Stratum granulosum der Area dentatae zum Hilus. Sie umfasst die basale (innenliegende) Zellschicht des Stratum granulosum und eine circa zwei Zellkerne breite Zone des Hilus. In Abbildung 6 B ist die subgranulare Zone in der Übersichtsaufnahme, die einen Koronarschnitt durch das adulte Mausgehirn (P 90) auf Höhe des Hippocampus zeigt, durch eine rote Linie markiert. Die nervale Eingangsstation des Hippocampus ist der Gyrus dentatus, dessen dicht gepackte

Hauptzellen, die sogenannten Körnerzellen, im Stratum granulosum liegen. Die weiter außen gelegene Molekularschicht enthält fast nur Nervenfasern und ist daher in einer Zellkernfärbung (zum Beispiel Hoechst) kaum markiert. Das Stratum pyramidale ist die zellkernreiche Schicht des eigentlichen Hippocampus, der in vier Teile unterteilt (CA1-CA4) wird, wobei CA4 dem Hilus entspricht. Die schematische Zeichnung rechts zeigt die eigentliche SGZ, die aus an den Hilus angrenzenden neuralen Stammzellen Typ 1 (GFAP+/Nestin+/Sox2+), Typ 2a (Nestin+/Sox2+) und Typ 2b (Nestin+/Dcx+) durchwandernden sich teilenden Vorläuferzellen und tiefer gelegenen kleinen rundlichen Neuroblasten (Typ 3, Dcx+) inmitten der granulären Neuronen besteht. Typ 2 Zellen entstehen durch asymmetrische Teilung aus Typ 1 Zellen, haben kurze Zellfortsätze und können tangential migrieren. Vom Prinzip ist das Stammzellpotential und die Entwicklung über die einzelnen Vorläuferstufen ähnlich der SVZ. Es gibt aber auch Arbeiten, die lediglich auf einzelne Zelllinien beschränkte Vorläuferzellen gefunden haben (153;154).

Experimentell können die sich selbst erneuernden neuronalen Vorläuferzellen (NVZ) der Keimzellregionen isoliert und als Zellkultur angezüchtet werden. Bei Anwesenheit von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) proliferieren die Zellen. Werden die Wachstumsfaktoren weggelassen, differenzieren die Zellen je nach Einfluss weiterer Faktoren zu Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten (155;156).

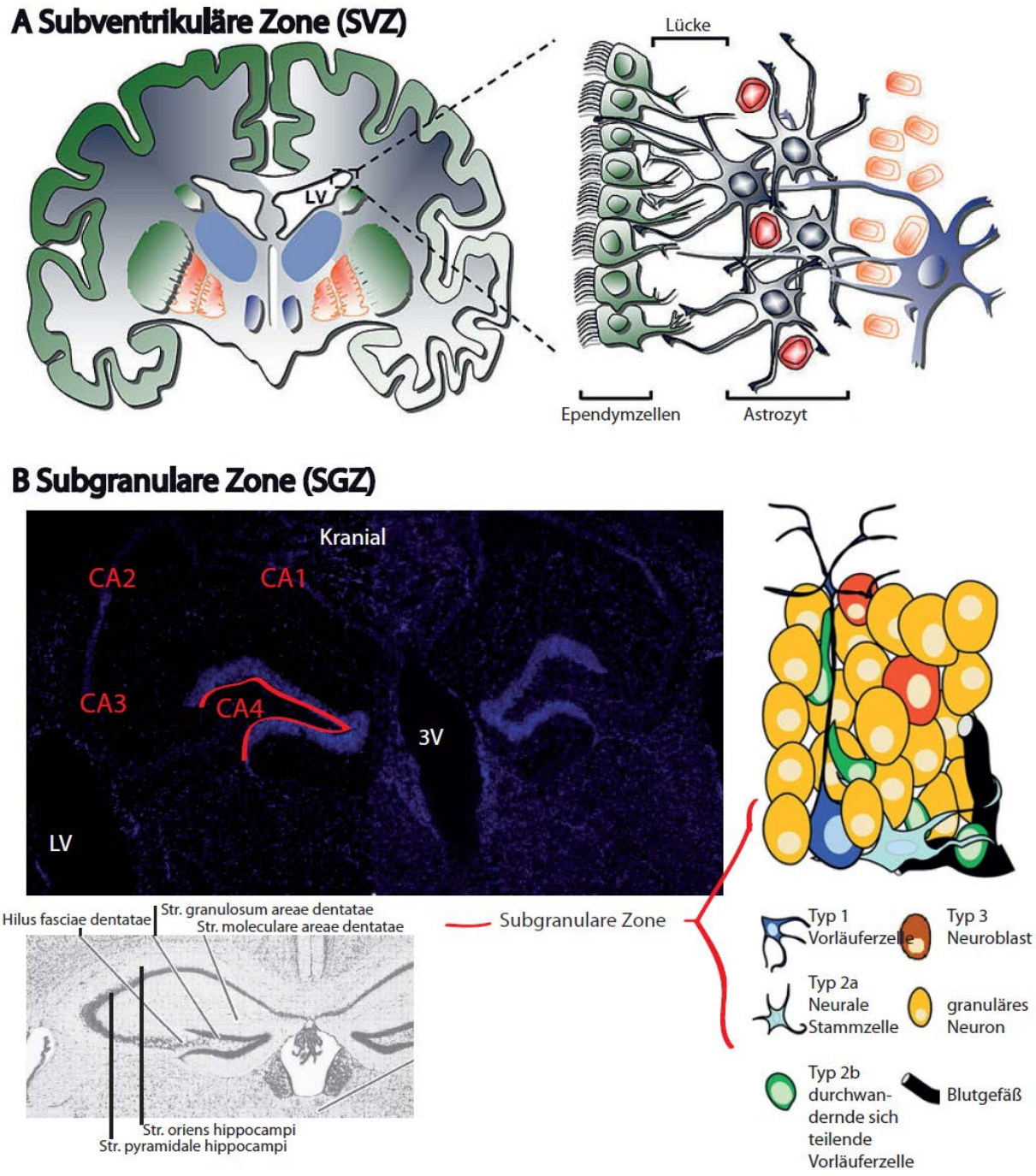


Abbildung 6: Übersicht der wichtigsten germinativen Zonen in adulten Mäusen. A: Subventrikuläre Zone *liegt lateral der Seitenventrikel, hier ist die koronare Übersicht eines adulten menschlichen Gehirns auf Höhe der Basalganglien gezeigt. Die schematische Zeichnung rechts zeigt die Zytoarchitektur der adulten menschlichen SVZ. Sie besteht aus Ependymzellen (Schicht I), gefolgt von einer hypozellulären Lücke (Schicht II) und dem sich anschließenden Astrozytenband (Schicht III), das sich aus Astrozyten ähnlichen Zellen und den durchwandernden Neuroblasten (rote Zellen) zusammensetzt. Die Schicht IV ist eine Übergangszone, die Oligodendrozyten (blau) enthält.*
B: Subgranulare Zone *in der Übersichtsaufnahme, durch eine rote Linie markiert. Koronarschnitt durch das adulte Mausgehirn (P 90) auf Höhe der Hippocampusformation. Die schematische Zeichnung rechts zeigt die eigentliche SGZ, die aus an den Hilus angrenzenden neuralen Stammzellen (hellblau), durchwandernden sich teilenden Vorläuferzellen (grün) und tiefer gelegenen Neuroblasten (rot) besteht. LV: lateraler Ventrikel, 3V: dritter Ventrikel, CA1 – CA4: Cornu ammonis. In Anlehnung an Arias-Carrion 2008 (4).*

1.7 Fragestellung

Der Einfluss von Sirt1 auf die Zelllinie der Oligodendrozyten ist weitgehend unbekannt. Dies ist aber wichtig zu wissen, da Sirt1 in EAE Mäusen vermehrt exprimiert wird (5) und die mangelnde Remyelinisierung in demyelinisierenden Erkrankungen unter anderem auf unzureichende Regenerationsfähigkeit der Oligodendrozyten zurückzuführen ist. Daher stellte sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob Sirt1 (HDAC Gruppe III) sich in den Zellen der Oligodendrozytenlinie findet, dort einen Einfluss auf die Differenzierung hat und ob die Expression von Sirt1 dort sich in der EAE verändert.

Lokale Expressionsmuster von Sirt1 im ZNS der gesunden Maus

In bisherigen immunhistologischen Analysen unserer Arbeitsgruppe sind im postnatalen (P2) ZNS viele Sirt1+ Zellen in der SVZ des Seitenventrikels und entlang des rostralen Migrationsstrom (RMS) gefunden worden. Allerdings blieb offen, in welchen anderen Zellen des gesunden Gehirns Sirt1 exprimiert wird. Insbesondere wurde bisher nicht untersucht, ob Sirt1 auch in den OVZ beziehungsweise reifen Oligodendrozyten zu finden ist. OVZ machen fünf bis acht Prozent aller Gliazellen aus (94) und sind eine wichtige Quelle der Remyelinisierung unter entzündlichen Bedingungen.

Analyse von Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Tieren und Zellen – beeinflusst Sirt1 die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Oligodendrozyten?

Es ist bekannt, dass Sirt1 in die Zelldifferenzierung von NVZ involviert ist und unter oxidativen Bedingungen die Differenzierung in Richtung der Astrozyten lenkt (5). Es ist aber bisher nicht bekannt, ob Sirt1 die Entwicklung der Oligodendrozyten beeinflusst.

Dies ist aber naheliegend, da HDAC der Gruppen I und II für die gezielte Spezifizierung beziehunsweise folgende Differenzierung von Oligodendrozyten notwendig sind (99) und in OVZ mit ausgeschalteter Sirt2 Funktion (HDAC Gruppe III) *in vitro* eine Differenzierung der Zellen in ein reiferes Stadium beobachtet werden kann (81).

Sirt1 Expression unter den entzündlichen Bedingungen der EAE

Bisher konnte gezeigt werden, dass Sirt1 in EAE Mäusen in GFAP+ Zellen vermehrt exprimiert wird (5). Ziel dieser Arbeit ist es, die vermehrte Ausprägung genauer zu charakterisieren. Insbesondere blieb bisher offen, ob Sirt1 sich in den Zellen der Oligodendrozytenlinie findet beziehungsweise sich die Expression dort in der EAE verändert.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Feinwaage 770	Kern
Fluoreszenz Mikroskop BX51 U-RFL-T	Olympus
Kamera F-View II U-CMAD3 und ColorView III U-TVO.5XC-3	Olympus
Mikroskop	hund Wetzlar
Kryostat CM1900 UV	Leica
Kühlzentrifuge 5417R	eppendorf
Kühlzentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen
Real Time PCR System 7500	Applied Biosystems
Mastercycler T Personal	Biometra
Unimax 1010 + Inkubator 1000	Heidolph Instruments
Wasserbad	GFL
Pipetten	eppendorf
Shaker Ika Vibrox	VXA
Sterilbank	Hera safe
Vortex-T Genie2	Scientific industries
Kühlschrank +4/-20°C	Liebherr
Zellkultur CO2-Inkubator Steri Cycle	Thermo Scientific

2.2 Verbrauchsmaterialien:

Deckgläser	Menzel Gläser
Objektträger, adhäsive, silanisierte Oberfläche	Marienfeld
Reagiergefäß verschiedene Größen	Eppendorf
Petrischale (100x20 mm)	Sarstedt
sterile Gefäße 15/20 ml	Greiner bio-one
6-Well-Platte steril Cellstar	Greiner bio-one
12-Well-Platte steril Cellstar	Greiner bio-one
96-Well-Platte steril Cellstar	Greiner bio-one
T25-Kulturflasche	Greiner bio-one
T50-Kulturflasche	Greiner bio-one
T75-Kulturflasche	Greiner bio-one
Optical 96-well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml) + Adhesive Covers	Applied Biosystems

2.3 Reagenzien und Chemikalien:

Von RNA Isolation bis (RT-)PCR

Trifast Solution 30-2020	peqlab
Chloroform	Sigma
Isopropanol 100%	Sigma
Ethanol	Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
RNAse freies Wasser	Sigma
Rneasy Mini Kit (250)	Quiagen
Super Script II Reverse Transkriptase (10.000Units)	Invitrogen
Taq Man RT Reagents (200Reak.) (Buffer (x10), dNTP (10mM), 25 mM MgCl2, Random Hexamers (50µM), MultiScribe RT (50U/µl), RNase Inhibitor (20U/µl))	Applied Biosystem
Platinum SYBR Green	Invitrogen

Syber Green PCR Master Mix		Applied Biosystem
Taqman Master Mix		Applied Biosystems

Gehirnschnitte bis Immunofluoreszenz

PFA 4%, Normal Goat Serum (NGS), Triton 10%		Invitrogen
Immu Mount		Thermo Scientific
Tissue-Tek® Compound		Sakura

Immunohistochemie - ABC

Methanol p.A.		Merck
Avidin Biotin Blocking Kit	Cat.No VEC-SP-2001	Biozol
Biotinylated Anti Chicken IgG (H+L)	Cat.No VEC-BA-9010	Biozol
Normal Goat Serum	Cat.No VEC-S-1000	Biozol
Vector® Hematoxylin QS 100ml	Cat.No VEC-H-3404	Biozol
Vector® Methyl Green 500ml	Cat.No VEC-H-3402	Biozol
VECTAstain® EliteABC Kit (Rabbit IgG)	Cat.No VEC-PK-6101	Biozol
Vector® VIP substrate Kit for peroxidase	Cat.No VEC-SK-4600	Biozol
DAB Substrate Kit	Cat.No VEC-SK-4100	Biozol
Brd U		Sigma
VectaMount ™ 60ml	Cat.No VEC-H-5000	Biozol

Experimentelle autoimmune Encephalomyelits (EAE)

Pertussis Toxin (Salt-Free)	Quadratech
Freund`s Complete Adjuvant	Difco
Mycobacterium Tuberculosis H37Ra	Difco
Isofluran	DeltaSelect
MOG 35 – 55 Peptid	Pepceuticals
PLP 139-151 Peptid	Pepceuticals

2.4 Zellkulturmedien und (Wachstums-)faktoren

Poly-L-Ornitine Solution 0,01%	Sigma
PBS	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
Neuro Basal	Invitrogen
HBSS +/+	Invitrogen
HBSS -/-	Invitrogen
Papain Nr.10108014001	Roche
Cystein Nr. C1276	Sigma
B27 supplement (without Vita)	Invitrogen
B27 supplement	Invitrogen
FGF (rec human)	Invitrogen
EGF (rec mouse)	Invitrogen
Penicillin Streptomycin	Invitrogen
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Glutamax	Invitrogen
Rnase- Free Dnase (50)	Quiagen
Trypsin 0,5% (10x)	Invitrogen

2.5 Zellkulturen

2.5.1 Isolation von neuronalen Vorläuferzellen (NVZ)

Die Isolation der cerebralen, kortikalen NVZ wurde an siebzehn Tage alten Mäuseembryonen (C57BL/6) mit unbekanntem Geschlecht durchgeführt. Zunächst wurde dazu das tragende Muttertier mit Isofluran anästhesiert und durch Dekapitation getötet. Nach Entnahme der Embryonen wurden deren Gehirne isoliert und in sterilem HBSS (inklusive Penicillin/Streptomycin) weitestgehend von Meningen befreit. In frischem HBSS + P/S wurden die Gehirne zerkleinert und bei 4°C in Neurobasal Medium oder HBSS zügig aus den Arbeitsräumen des Tierhauses in unser Labor verbracht. Durch einminütiges Zentrifugieren bei 24°C mit 1000rpm konnte das überschüssige Medium entfernt werden und anschließend die Trypsinisierung (0,25 Prozent in HBSS) für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt werden. Das bis auf 15 ml aufgefüllte Falcon konnte dann erneut diesmal für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt werden. In 500 µl HBSS -/- (inklusive 10 Prozent FCS, 1:100 DNAse) wurden die Zellen durch hoch und runter pipettieren homogenisiert und durch abwechselndes HBSS auffüllen/ zentrifugieren (5 Minuten, 1000rpm, 25°C)/ absaugen gewaschen, solange bis der Überstand klar war (circa zwei- bis dreimal). Die Zellen konnten dann in Proliferationsmedium auf Petrischalen gebracht werden (5 ml Zellsuspension und 5 ml zusätzliches Proliferationsmedium).

Für das Proliferationsmedium wurden sowohl 50 ml Neurobasal Medium, 1 ml B 27 Zusatz (ohne Retinolsäure), jeweils 500 µl GlutaMAX (100x) und Penicillin/Streptomycin (x100) als auch 10 µg/ml bFGF und 10µg/ml EGF verwendet.

Die Kultivierung erfolgte dann im Dreitageszyklus durch Mediumaustausch.

2.5.2 Isolation von Vorläuferzellen aus adulten Mäusen

Die Isolation von Vorläuferzellen aus adulten Mäusen erfolgte analog dem obigen Protokoll. Allerdings nicht aus dem kompletten adulten Gehirn, sondern es konnte zum Beispiel zwischen SVZ oder Zerebellum unterschieden werden.

2.5.3 Passagieren und Mediumwechsel

Alle drei bis vier Tage erfolgte ein halber Mediumwechsel, nach sieben Tagen wurden die Zellen passagiert. Das bedeutet die Zellen wurden in einem 50 ml Falcon bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension in HBSS -/- und erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen erfolgte die erneute Aussaat in dem gewünschten Medium (Proliferationsmedium).

2.5.4 Vorbereitung der Poly-L-Ornithin Beschichtung

Zur besseren Haftung und Differenzierung erfolgte die Differenzierung der NVZ auf Poly-L-Ornithin, einer Polyaminosäurebasis, die vorher auf die Zellkulturflaschen/Lochplatte aufgebracht wurde. Dazu wurden 2 ml Poly-L-Ornithin mit 100 µl Penicillin/Streptomycin (x100) und 8 ml HBSS -/- zu einem Lösungsansatz verarbeitet und dann von dieser Lösung 2 ml pro T25 Zellkulturflasche aufgetragen und für mindestens 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Flaschen zweimal mit 4 ml HBSS pro Flasche gewaschen. Anschließend konnten die NVZ in Proliferationsmedium (5 ml pro T25 Flasche) eingebrachte werden.

2.5.5 Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen

Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die Differenzierung der NVZ in T25-Zellkulturflaschen in 5 ml Differenzierungsmedium auf einer Poly-L-Ornithin Basis. Ein Ansatz Differenzierungsmedium wurde hergestellt aus 50 ml Neurobasal Medium, 1 ml B 27 Zusatz (mit Retinolsäure) und jeweils 500 µl GlutaMAX (100x) und Penicillin/Streptomycin (x100).

2.6 RNA Isolation

2.6.1 RNA Isolation aus kultivierten Zellen

Die RNA Isolation erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Diese Methode funktioniert durch Phenol-Chloroform Extraktion mit ethanolischer Ausfällung der RNA in der wässrigen Phase. Zunächst wurde das Medium entfernt und dann 350 µl RLT Puffer (mit 10 Prozent β-Mercaptoethanol v/v) für einige Sekunden auf die Zellen gegeben. Laut Herstellerangaben reicht diese Menge bis zu einer Zellzahl von $5x10^6$ Zellen. Anschließend wurde die gleiche Menge an eiskaltem 70% EtOH (-20°C) hinzugegeben und das Gemisch nach mehrmaligem Resuspendieren in die vom Hersteller mitgelieferten Zentrifugationssäulen überführt, die jeweils in einem Eppendorf Gefäß stecken. Diese Säulen besitzen jeweils eine Membran, die bei der nun folgenden Zentrifugation für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit (+4°C) die RNA zurückhielten. Der Durchlauf wurde verworfen und dann 700 µl RW Waschpuffer 1 hinzugegeben. Unter oben genannten Konditionen erfolgte eine erneute Zentrifugation, nach der wieder der Durchlauf verworfen wurde. Anschließend gab man 500 µl RPE Waschpuffer hinzu, zentrifugierte erneut unter obigen Bedingungen und verwarf den Durchlauf. Dieser letzte Schritt wurde zur weiteren Aufreinigung noch einmal wiederholt. Um Verunreinigungen zu vermeiden erfolgte danach eine sogenannte trockene Zentrifugation ohne Zugabe von neuem Puffer. Anschließend konnte die Säule in ein neues Eppendorf Gefäß überführt werden. Auch dieser Schritt wurde

zur Sicherheit noch einmal wiederholt. Nach Zugabe von 50 µl RNAse freiem Wasser erfolgte die Zentrifugation erneut unter obigen Bedingungen, diesmal aber für eine Minute. Die isolierte RNA befand sich nach diesem Schritt dann im Durchlauf und wurde in ein neues steriles Eppendorf Gefäß überführt. Auf Grund der geringeren Stabilität wurde ein Teil der RNA direkt in cDNA überschrieben und der Rest bei -80°C gelagert.

2.6.2 RNA Isolation aus verschiedenen Anteilen des ZNS, peqGOLD Trifast™

Für die qRT-PCR Analyse wurden verschiedene Anteile des zentralen Nervensystems isoliert, je nach Zielsetzung aus unterschiedlich alten Mäusen. Zunächst wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt, damit nach der folgenden Dekapitation zügig das Gehirn isoliert werden konnte. Die verschiedenen Anteile des zentralen Nervensystems (SVZ, Zerebellum, Kortex, Hirnstamm, Rückenmark, N. opticus, Bulbus olfactorius) wurden einzeln in Reagiergefäßen auf Eis gekühlt und direkt die RNA isoliert oder vorübergehend bei -80°C gelagert.

Die RNA Extraktion erfolgte ebenso nach der Phenol-Chloroform Extraktionsmethode mit Ausfällung der RNA durch Ethanol aus der wässrigen Phase. Dazu wurde im Einzelnen das frisch isolierte und durch Eis gekühlte Hirngewebe nach Zugabe von 1 ml peqGOLD Trifast™ Denaturierungslösung mit der Pipette homogenisiert und anschließend mit 200 µl Chloroform vermischt. Die folgende Zentrifugation erfolgte für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm). Danach konnte die obere Phase mit der löslichen RNA in ein steriles Reagiergefäß überführt werde. Das anschließende Auffüllen mit 100 Prozent Isopropanol gefolgt von abermaliger Zentrifugation diente der Reinigung der RNA. Durch Absaugen wurde das so entstandene Pellet freigelegt und ebenso mit diesmal 70 Prozent kaltem Ethanol (-20°C) verfahren. Anschließend trocknete das Pellet mit geöffneter Tubekappe bei +56°C für fünf bis zehn Minuten im Inkubator. Aufgelöst in 50 µl RNAse freiem Wasser wurde ein Teil der RNA direkt in cDNA umgeschrieben und der Rest bei -80°C gelagert.

2.7 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des „*Applied Biosystem Kit*“ durchgeführt. Zuerst wurden die enzymfreien Substrate dNTP, MgCl2, Random Hexamere und der dazugehörigen Puffer auf Eis arbeitend vermischt und dann mit MultiScribe™ Reverse Transkriptase und RNase Inhibitor versetzt. Diese einzuhaltende Reihenfolge spiegelt sich auch in Tabelle 4 wieder.

Tabelle 4: Reaktionsgemisch *für die reverse Transkription der RNA in cDNA*

Reagenz	für 10µl Reaktionsansatz	für 20µl Reaktionsansatz
Puffer (x10)	1 µl	2 µl
dNTP (10mM)	2 µl	4 µl
MgCl2 (25mM)	2,2 µl	4,4 µl
Random Hexamers (50µM)	0,5 µl	1 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/µl)	0,25 µl	0,5 µl
RNase Inhibitor (20U/µl)	0,2 µl	0,4 µl
zuvor isolierte RNA	4 µl	8 µl

Das Reaktionsgemisch wurde auf 0,5 ml Eppendorf Reagiergefäße verteilt (6,15 µl für den 10 µl Ansatz und 12,3 µl für den 20 µl Ansatz). Nach Zugabe der zuvor isolierten Gesamt-RNA (entweder 4 µl oder 8 µl) konnte durch mehrfaches Pipettieren und wenige Sekunden kurzes Zentrifugieren sichergestellt werden, dass sich alle Substanzen des Reaktionsansatzes gleichmäßig vermischen.

Das eigentliche Umschreiben in cDNA erfolgte im Gene Amp® PCR System 9600. Dieser inkubierte für zehn Minuten bei 25°C, damit die *Random Hexamere* sich anlagern konnten (*Annealing*). Anschließend erfolgte die reverse Transkription für 45 Minuten bei 48°C und die Inaktivierung der Transkriptase für fünf Minuten bei 95°C. Langsam auf Raumtemperatur heruntergekühlt konnten die cDNA-Proben bei -20°C gelagert oder direkt für die qRT-PCR verwendet werden.

2.8 qRT-PCR

Die quantitative *realtime* PCR wurde in einem ABI P RISM 7700 *Sequence Detection System* durchgeführt. Unter Verwendung des *Master Mix* wurde sowohl ein PCR Mix für jedes Zielgen als auch für das *Housekeeping* Gen angefertigt. Die Reaktionsansätze bestanden aus *Master Mix* (x2), Vorwärts-Primer, Rückwärts- Primer, cDNA der verschiedenen Proben, sterilem Wasser und entweder fluorogenen Sonden (*Probes*) oder SYBR Green und ROX *Reference Dye*. Die benutzten Primer und die genauen Mengenangaben finden sich in Tabelle 5 und Tabelle 7. Eine PCR bestand aus 45 Zyklen, wobei jeder Zyklus 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 60 Sekunden *Annealing* bei 60°C beinhaltete. Jede Reaktion wurde doppelt ausgeführt.

Tabelle 5: Primer für RealTime PCR – *Die Primer wurden mit der Primer Express Software bestimmt. Sie beinhalten ein Intron > 1000 bp und das Amplicon liegt zwischen 100 -150 bp*

Zielgen	Zugangsnr.	Primer ID	Sequenz 5' ➡ 3'
GAPDH		Forward Primer	CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCA
		Reverse Primer	CCATTCTCGGCCTTGACTGT
		Probe (Fam/TAMRA)	TGACTCCACTCACGGCAAATTCAACGT
mSirt 1	NM_019812.1	Forward Primer	GATGACGATGACAGAACGTCACA
		Reverse Primer	GGATCGGTGCCAATCATGAG
		Probe (Fam/TAMRA)	CGCGGATAGGTCCATATACTTTGTTCAGCAAC
mSirt 2		Forward Primer	GCAGTTCAAGCCAACCATCTG
		Reverse Primer	CTCGTTCCAGCGTGTCTATGTT
mSirt 3		Forward Primer	CCTGCAAGGTTCCTACTCCATATG
		Reverse Primer	TTCAGACAAGCTGGCAAAAGG
mSirt 4		Forward Primer	GCTCTGAGCAACTGGGAGAGA
		Reverse Primer	ACAGTTCAGGCACAGGACTCTGT
mSirt 5		Forward Primer	TTGTGGTCATCACCCAGAACA
		Reverse Primer	CGAGGTACACCGAGTTTTAAATAAGG
mSirt 6		Forward Primer	CCTGGTCAGCCAGAACGTAGA
		Reverse Primer	CCACAACCGTGTCTCTGACGTA
mSirt 7		Forward Primer	TACACGGGCGCTGGAATC
		Reverse Primer	TCCTTTCTGAAGCAGTGTCCATACT
Nampt		Forward Primer	TGCAGCTATGTTGTAACCAATGG
		Reverse Primer	GGCCCTTTTTTGACCTTTTGT
PARP 1		Forward Primer	TCCCATCGACGTCAACTACGA
		Reverse Primer	CGTGGTAGCATGAGTGTTCTTCA
Sox9		Forward Primer	CGGAACAGACTCACATCTCTCCTA
		Reverse Primer	CGGCGGACCCTGAGATT
Sox10		Forward Primer	ACCCTCACCTCCACAATGCT
		Reverse Primer	CCTCTCAGCCTCCTCAATGAA
p19ARF		Forward Primer	CGCTCTGGCTTTCGTGAAC
		Reverse Primer	GTGAACGTTGCCCATCATCA
p16INK4a		Forward Primer	AGACCGACGGGCATAGCTT
		Reverse Primer	CGCTAGCATCGCTAGAAGTGAA
ID1		Forward Primer	CCCTGAACGGCGAGATCA
		Reverse Primer	CTTTTTTCCTCTTGCCTCCTGAA
ID2		Forward Primer	CCGCTGACCACCCTGAAC
		Reverse Primer	TGGTGAAATGGCTGATAACAAAA
ID3		Forward Primer	CGGACGGTCCGCATCTC
		Reverse Primer	GCTGGAGAGAGGGTCCCAGAGT
Olig1	NM_016968.4	Forward Primer	ACGTCGTAGCGCAGGCTTAT
		Reverse Primer	CTCGCCCAACTCCGCTTAC
Olig2	NM_016967.2	Forward Primer	CCGAAAGGTGTGGATGCTTATT
		Reverse Primer	CTAAGCTCTCGAATGATCCTTCTTTT
Hes1	NM_008235.2	Forward Primer	CAGACATTCTGGAAATGACTGTGAA
		Reverse Primer	CGCGGTATTTCCCCAACAC
		Probe (Fam/TAMRA)	CACCTCCGGAACCTGCAGCG
Hes5	NM_010419.4	Forward Primer	GGCGGTGGAGATGCTCAGT
		Reverse Primer	GCTGCTCTATGCTGCTGTTGA
Mash 1	NM_008553.4	Forward Primer	GAGGGATCCTACGACCCTCTTAG
		Reverse Primer	TTTCTGCCTCCCCATTTGAC

		Probe (Fam/TAMRA)	CCTGCATCTTTAGTGTTTCTCGCCAACG

Tabelle 6: Primer für Genotypisierung – *Die Primer wurden mit der Primer Express Software bestimmt. Sie beinhalten ein Intron > 1000 bp und das Amplicon liegt zwischen 100 -150 bp*

Zielgen	Zugangsnr.	Primer ID	Sequenz 5' ➡ 3'
Sirt1	NM_019812.1	wt – forward primer	CTTGCACTTCAAGGGACCAA
		wt – reverse primer	GTATACCCACCACATCTGAG
		ko – reverse primer 2	CTACCACTCCTGGCTACCAA

Tabelle 7: *Einfacher RealTime PCR Reaktionsatz für 20µl*

Reagenzname	SYBRGreen Analyse	Analyse mit fluorogener Probe
MasterMix (x2)	5 µl	10 µl
SYBRGreen	5 µl	-
ROX Reference Dye	0,1 µl	-
Forward Primer	1 µl	1 µl
Reverse Primer	1 µl	1 µl
Fluorogene Probe	-	1 µl
dH2O	2,9 µl	2 µl
cDNA	5 µl	5 µl

Um die relative Menge an spezifischer DNA normalisiert auf GAPDH zu erhalten wurde das ΔΔCt-Verfahren angewendet. Dazu wird zuerst von jedem ungemittelten Ct-Wert der Zielgene jeweils einer der beiden Ct-Werte des *Housekeeping* Genes subtrahiert. Anschließend werden die so ermittelten Differenzen (ΔCT) jeweils als negativer Exponent von 2 berechnet, um die dimensionslose relative Expression (ΔΔCT) zu erhalten. Hieraus kann dann der Mittelwert und die Standardabweichung beziehungsweise der Standardfehler berechnet werden.

2.9 Versuchsaufbauten spezieller Zellkulturexperimente

Soweit spezielle Konditionen und Versuchsaufbauten in den Zellkulturen erfolgten, folgt eine detaillierte Beschreibung.

2.9.1 Versuchsaufbau der Alterung von NVZ in vitro

Der Versuchsaufbau findet sich in Abbildung 7. Die ersten RNA Isolationen (frühe Passagen) erfolgten nach drei Passagen, die alle drei Tage stattfanden. Die zweiten RNA Isolationen (späte Passagen) nach 15 Passagen, wobei die Zellen jeweils für null bis acht Tage vor der Isolation in Differenzierungsmedium gehalten wurden.

Die aus E17 Embryonen isolierten NVZ (2.5.1) wurden zunächst in Proliferationsmedium auf Poly-L-Ornithin (2.5.4) kultiviert und dann für die angegebene Anzahl von Tagen in

Differenzierungsmedium (2.5.5) überführt. Vor der RNA Isolation (2.6.1) sind die Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert worden.

Die qRT-PCR (2.8) erfolgte nach Abschluss des Experiments für alle Zeitpunkte gleichzeitig, um Fehlerquellen durch unterschiedliche Messungsbedingungen auszuschließen. Bis zur Messung wurden alle Proben als cDNA (2.7) bei -20°C gelagert.

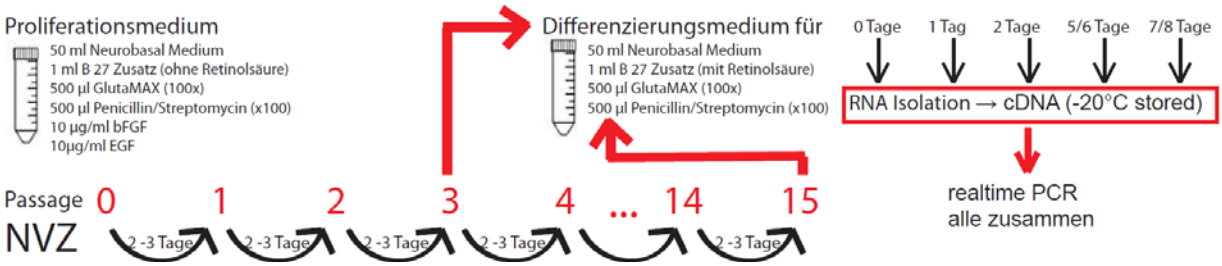


Abbildung 7: Versuchsaufbau der Alterung von NVZ in vitro: *Die Passagen erfolgten in Proliferationsmedium, nach der dritten bzw. 15. Passage wurden die NVZ in Differenzierungsmedium überführt und nach null bis 7/8 Tagen in Differenzierungsmedium wurde die RNA isoliert und in cDNA überschrieben. Die realtime PCR erfolgte am Ende für alle Proben gemeinsam.*

2.9.2 Stimulation mit Interferon γ in TSA3 Zellen

Um die Stimulation mit IFNγ zu simlieren, wurden in diesem Experiment zunächst TSA3 Zellen (Astrozytenzelllinie) auf Poly-L-Ornithin kultiviert, da aus vorherigen Experimenten (5) bekannt war, dass Sirt1 in Astrozyten exprimiert wird und diese Astrozyten in der EAE reagieren (reaktive Gliose). Für fünf Tage wurden die Zellen in Differenzierungsmedium gehalten und dann für 24 Stunden mit Interferon γ (100 U/ml) stimuliert. Die RNA Isolation erfolgte gemäß Protokoll (2.6.1), gefolgt von der Konvertierung zu cDNA (2.7) und qRT-PCR (2.8).

Im zweiten Teil wurden NVZ mit IFNγ stimuliert. Nachdem NVZ aus E17 Kortices oder aus der adulten subventrikulären Zone isoliert und drei- bis viermal passagiert wurden (2.5.1), erfolgte eine Kultivierung von je 50.000 Zellen auf Poly-L-Ornithin für sechs Tage. Danach wurden diese ebenfalls für 24 Stunden einer Stimulation mit 100 U/ml Interferon γ unterzogen und anschließend die RNA isoliert, umgeschrieben und in der qRT-PCR ausgewertet.

2.9.3 Oligodendrozytendifferenzierung in Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ ex vivo

Für diesen Teil der vorliegenden Arbeit wurden NVZ (siehe 2.5.1) aus Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$- (siehe 2.11) und Wildtypembryonen (E17) isoliert und in Proliferationsmedium kultiviert.

Im ersten Teil wurden die dreimal passagierten, auf Poly-L-Ornithin gezogenen NVZ zu je 200.000 Zellen für drei Tage in oben aufgeführtem Medium differenziert. Anschließend wurden die Zellen isoliert, die RNA isoliert und abschließend als Screening in der quantitativen RT-PCR 22 verschiedene Transkriptionsfaktoren analysiert.

Um die Beeinflussung der Oligodendrozytenentwicklung auch auf Proteinebene in NVZ zu bestätigen, erfolgte nach einer dreitägigen Kultivierung der isolierten NVZ in Gegenwart der Wachstumsfaktoren bFGF (5 ng/ml)/EGF (5 ng/ml)/PDGFα (100 ng/ml) die Differenzierung der Zellen für drei, beziehungsweise sieben Tage in einem Prozent FCS Serum mit T3/T4 zur Oligodendrozyteninduktion. In einem weiteren Ansatz erfolgte nach einer dreitägigen Kultivierung der isolierten NVZ in Gegenwart der Wachstumsfaktoren bFGF (5 ng/ml)/EGF (5 ng/ml) die Differenzierung der Zellen für fünf Tage in oben aufgeführtem Differenzierungsmedium (2.5.5) ebenfalls unter dem Zusatz der Thyroidhormone T3/T4 zur Induktion der Oligodendrogenese (158);(159). Die weitere Analyse der Zellen erfolgte durch Immunzytochemie.

2.10 Immunhistologie

2.10.1 Aufarbeitung der Gehirne für die indirekte Immunhistochemie

Die Tiere wurden mit Isofluran betäubt. Nach Einsetzen der Analgesie wurde eine Thorakotomie mit anschließender Kanülierung des linken Ventrikels durchgeführt und der rechte Vorhof beziehungsweise die Vena cava inferior eröffnet. Eine circa 10 Minuten dauernde Perfusion mit PBS führte im Regelfall zu einer fast vollständigen Entfernung des Blutes aus dem Körperkreislauf.

Zur Konservierung der histologischen Strukturen des zentralen Nervensystems für die Immunhistologie hat sich eine nachfolgende Perfusion mit 4 % Paraformaldehyd bewährt. Dadurch werden Zellstrukturen fixiert und die eintretenden autolytischen Prozesse gestoppt.

Das Gehirn und das Rückenmark wurden freipräpariert und über Nacht bei 4°C in 4 % Paraformaldehyd auf dem Rüttler nachfixiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschgang mit PBS für jeweils über eine halbe Stunde bei 4°C, insgesamt über fünf Stunden. Die erneute Lagerung über Nacht in 30 % Saccharose Lösung (in PBS) diente dem Entzug des restlichen Zellwassers, um eine Zerstörung des Gewebes zu vermeiden. Abschließend wurden die Gehirne in *Tissue Tek*® gebettet und durch flüssigen Stickstoff tief gefroren, um bei -80°C gelagert werden zu können. Die Gehirne wurden mit einer Schnittdicke von 10 µm am Kryostaten entweder sagittal, horizontal oder koronar geschnitten, auf Objektträgern gesammelt und aufrecht bei -20°C für kurze Zeit oder längerfristig bei -80°C gelagert. Das Rückenmark wurde entsprechend behandelt und horizontal mit einer Schnittdicke von 10 µm geschnitten.

Zur Analyse der embryonalen Entwicklungsstadien wurden alle Embryonen aus der heterozygoten narkotisierten Mutter isoliert, von Eihäuten und Meningen befreit, das Gehirn isoliert, genotypisiert und anschließend gemäß 2.10.1 für die indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet und koronar geschnitten.

2.10.2 Indirekte Immunofluoreszenz

Die Gewebsschnitte wurden für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur (wie alle folgenden Schritte, wenn nicht anders beschrieben) luftgetrocknet und anschließend mit Dako Pen® umrandet. Für zwei Stunden befanden sich die Schnitte dann in Pufferlösung (PBS) mit 5 % Normalem Ziegenserum (NGS) und 0,5 % Triton in einer 37°C warmen feuchten Kammer, damit einmal unspezifische Bindungen blockiert und gleichzeitig die Zellmembranen permeabler gemacht werden konnten. Vor jedem jetzt folgenden Schritt wurde natürlich überschüssige Flüssigkeit durch vorsichtiges Absaugen entfernt.
Die Inkubation mit den Primärantikörpern aus der Tabelle 8 erfolgte zuerst für zwei Stunden bei 37°C in der feuchten Kammer und anschließend bei 4°C über Nacht im Dunklen auf dem Shaker. Die Herkunft und Verdünnung der entsprechenden Antikörper finden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 8: *Übersicht aller in der Immunhistochemie benutzten Primärantikörper*

Antikörper gegen	Herstellung in	Herkunft	Firma	Anwendung	Verdünnung
BrdU	mouse	clone BU5.1	Millipore	Inkorporation in vivo/ in vitro	
CNPase	mouse	clone 11-5B	Sigma	Gehirn CNPase in Oligodendrozyten	1:500
GFAP	rabbit		Sigma	Astrocytenplasma und Stammzellen	1:400
GFAP	mouse	clone GA5	Millipore		1:400
GFAP	guinea pig		Synaptic Systems		1:500
Ly6c	hamster		Antibodies online	Einwandernde Makrophagen	1:200
acH3K9	rabbit		Millipore	Anti-acetyl-Histone H3 (Lys9)	1:500
acH4K16	rabbit		Millipore	Anti-acetyl-Histone H4 (Lys16)	1:500
Iba 1	rabbit		Wako Pure Chemical	Mikroglia und Makrophagen	1:400
Mash1	rabbit		Santa Cruz		1:100
MBP	mouse	clone SKB3	Millipore	Myelinscheiden ZNS	1:1000
Nestin	rabbit		Millipore		1:100
NG 2	rabbit		Millipore	Oligodendrozyten VL	1:400
Olig 2	sheep		Abcam		1:500
Olig 2	rabbit		Millipore	Oligodendrozyten	1:400
PDGFR α	rabbit		Santa Cruz	Neurale Stammzellen SVZ	1:200
Prelm. Sirt1	chicken		Davids Biotechnologie		1:400
Sirt1	rabbit		Cell Signaling	AK gegen C-terminalen Teil	1:100

Sirt1	chicken		Davids Bio-technologie	AK gegen N-terminalen Teil (176aa – 190aa)	1:100
Sox 2	goat		Santa Cruz		1:100

Sie wurden jeweils in PBS mit 0,25 % Triton und 2,5 % NGS gelöst.
Der folgende Waschgang mit PBS wurde insgesamt dreimal für fünf Minuten im Dunklen durchgeführt.
Die Sekundärantikörper aus der Tabelle 9 wurden ebenfalls mit 0,25 % Triton und 2,5 % NGS gelöst und eine Stunde auf dem Rüttler im Dunklen inkubiert.

Tabelle 9: *Übersicht aller in der Immunhistochemie benutzten Sekundärantikörper*

Antikörper	**Herstellung in**	**Fluoreszenz**	**Verdünnung**
Hoechst		Zellkernfärbung blau	1:5000
anti chicken Cy3 Alexa 546 biotinylated	goat	rot rot	1:500 2-10 µg/ml
Alexa 488		grün	1:500
anti mouse Cy2 Alexa 488	goat	grün	1:500
Cy5	goat	rot	1:500
anti goat Alexa 546		rot	1:500
anti sheep		rot	1:500
anti rabbit Cy2 Alexa 488	goat	grün	1:500
Cy5	goat	rot	
anti guinea pig Cy5	goat	rot	1:500

Der folgende Waschgang wurde wie oben durchgeführt. Abschließend schützte ein Tropfen ImmuMount® jeden Gehirnschnitt und die Objektträger konnten mit Deckglas versehen horizontal über Nacht getrocknet und dann kurze Zeit bei 4°C gelagert werden.

2.10.3 Quantifizierung der immunhistologischen Gewebsschnitte

Die einzelnen Gehirnschnitte wurden je nach Fragestellung mit 10-, 20-, 40-, 60- oder 100facher Vergrößerung an einem Olympus BX51 Fluoreszenz Mikroskop untersucht und die Bilder mit einer Olympus F-View II beziehungsweise ColorView III Kamera aufgezeichnet. Alle Lokalisationen der einzelnen Regionen des ZNS erfolgten mit Hilfe der Bilder aus *The Atlas of Mouse Development* (160). Die Interpretation und Weiterverarbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS5.
Zur Zellzählung zum Beispiel der Sirt1+ und Olig2+ positiven Zellkerne wurden die einzelnen Farbkanäle in Photoshop isoliert betrachtet. Zunächst wurde in einer zusätzlichen Ebene die Fläche markiert, in der die Zellen gezählt werden sollten. Ausnahmslos wurde immer die gesamte weiße Substanz gewählt, die auf der Aufnahme (20fache Vergrößerung) in der

Hoechstkernfärbung (Abbildung 8) sichtbar war (1). Jetzt konnten für jede Farbebene einzeln (im Beispiel Sirt1 in rot und Olig2 in grün) die positiven Zellkerne gezählt werden, jeweils durch einen anders farbigen Punkt markiert (2-5). Es wurde durch einen Blick in die Hoechstebene überprüft, dass es sich auch wirklich um einen Zellkern handelt. Abschließend wurden beide Ebenen mit den Punkten übereinander gelegt, damit die doppelt positiven Zellen gezählt werden konnten (6). Durch das direkte Markieren der gezählten Zellen war ein Verzählen ausgeschlossen und durch das Überlagern der Zählebenen gelang die Bestimmung der doppelt positiven Zellen problemlos.

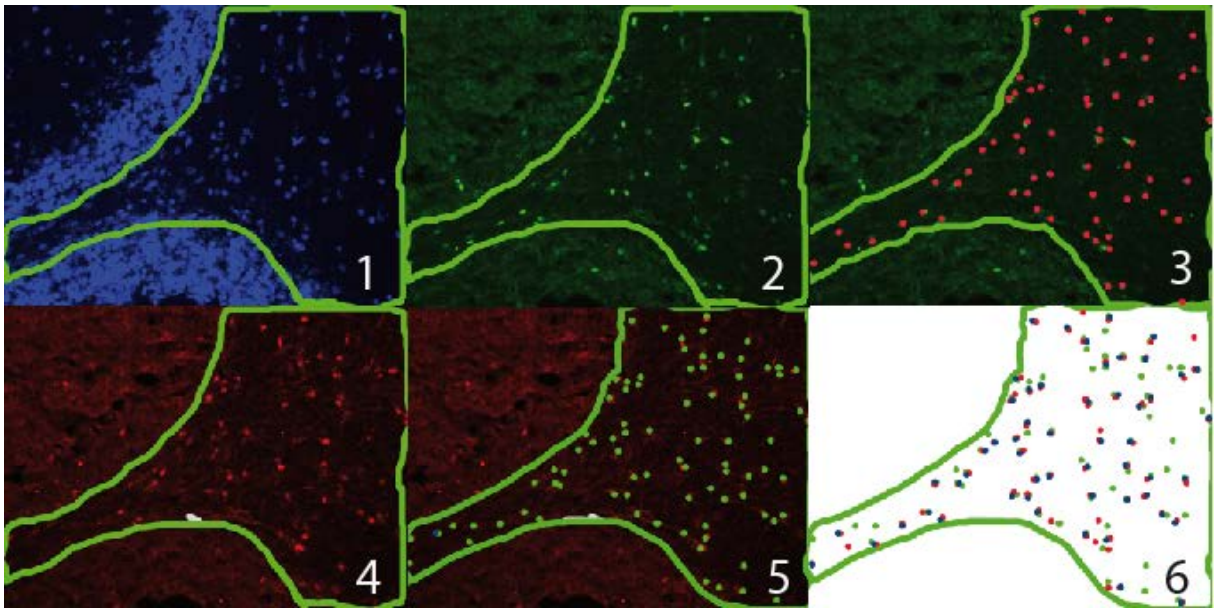


Abbildung 8 Darstellung der Zählmethode *der einzeln und doppelt gefärbten Zellen an Hand eines Beispiels. 1: Hoechst Färbung mit Flächenmarkierung 2: Olig2 positive (grün) Zellen 3: in rot gezählt 4: Sirt1 positive Zellen (rot) 5: in grün gezählt 6: Überlagerung der Zählebenen, um die doppelt positiven Zellen in blau zu zählen*

Die jeweilige Anzahl wurde in eine Tabelle übertragen (im Beispiel Sirt1+, Olig2+ und Olig2+/Sirt1+) und durch die Pixel der gezählten Fläche (im Beispiel grün umrandet) ergänzt. Die angegebenen Pixel wurden in µm umgerechnet (Mikrometer Standard für 20fache Vergrößerung aus dem benutzten Mikroskop), sodass die positiven Zellen pro Mikrometer weiße Substanz im Zerebellum angegeben werden konnten.

Die Zählung erfolgte grundsätzlich aus mindestens drei verschiedenen repräsentativen Bildern je Hirnschnitt. Aus jeder untersuchten Gruppe (zum Beispiel EAE versus gesunde Kontrolle) wurden immer mindestens jeweils drei Tiere und von jedem Tier drei Hirnschnitte zur Zählung verwendet.

2.10.4 Immunohistochemie – ABC Methode (Vectastain Elite ABC Kit)

Die Gewebsschnitte trockneten für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur (wie alle folgenden Schritte, wenn nicht anders beschrieben) und wurden anschließend mit Dako Pen® umrandet. Anschließend wurden die Schnitte ohne weitere Fixierung für 20 Minuten in 0,3 % H_2O_2 in Methanol gegeben, um endogene Peroxidasen zu blockieren und danach für zweimal drei Minuten in PBS gewaschen. Um endogenes Avidin und Biotin auf dem Mäusegehirnschnitt zu blocken und so Hintergrundfärbung zu minimieren, wurden die Schnitte erst für 15 Minuten mit der Avidin Lösung und nach einem kurzen Waschgang in PBS für 15 Minuten mit der Biotin Lösung (*Avidin/Biotin Blocking Kit*) inkubiert. Nach erneutem Waschen für zweimal zwei Minuten in PBS konnten die Schnitte für 20 Minuten mit normalem Serum geblockt werden (150 µl NGS Konzentrat in 10 ml PBS, Vectastain Elite Kit).

Der nun folgende Schritt mit einem primären Antikörper (verwendete Antikörper siehe oben) bei 4°C über Nacht im Dunklen auf dem Shaker erfolgte in 0,1 % *bovine serum albumin* (BSA) und 2,5 % NGS. Der Waschgang mit PBS wurde insgesamt zweimal für fünf Minuten durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde in diesem Fall eine Lösung mit Biotin markiertem IgG-Antikörper (*rabbit* oder *chicken*) und normalem Serum (150 µl NGS Konzentrat in 10 ml PBS, Vectastain Elite Kit) für 30 Minuten verwendet. Der folgende Waschgang mit PBS wurde insgesamt zweimal für fünf Minuten durchgeführt. Jetzt folgte der eigentliche ABC Schritt, das heißt eine dreißigminütige Inkubation im *Vectastain Elite ABC Reagent*. Dieses Reagenz besteht aus speziell präpariertem Avidin DH, das mit biotinilierter Meerrettich-Peroxidase H dreidimensionale Komplexe bildet, sodass eine Biotinbindungsstelle übrig bleibt. Dreißig Minuten im Voraus gebildet markiert der Komplex die Sekundärantikörper. Der folgende Waschgang wurde wie oben durchgeführt.

Als Substrat für die Peroxidase wurde entweder 3,3'-Diaminobenzidin (*DAB Substrate Kit* für Peroxidase, Vectastain) oder das Vector® VIP *purple* Substrat (Vectastain) genutzt. Wie im Protokoll beschrieben vorgegangen entstand nach zehnminütiger Inkubation eine braune oder purpurfarbende Färbung.

Abgespült in Leitungswasser wurden die Zellkerne mit Vector Hematoxylin QS (wie im Protokoll) oder Methylgrün von Vectastain (wie im Protokoll) gegen gefärbt. Abschließend schützte ein Tropfen VectaMount® jeden Gehirnschnitt und die Objektträger konnten mit Deckglas versehen horizontal über Nacht getrocknet und dann kurze Zeit bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.10.5 Spezifität unseres neuen chSirt1 Antikörpers

Der Antikörper gegen mSirt1 (IgY, gegen N-terminalen Proteinteil (176aa-190aa)) wurde von *Davids Biotechnology* GmbH durch Immunisation von Hennen und anschließender Aufreinigung aus Eidottern hergestellt. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch einen Western Blot bestätigt (Abbildung 9 Teil D, Prozorovski, unpublished). Im Vergleich mit dem kommerziellen rbSirt1 Antikörper zeigt sich das gleiche Muster der gefärbten Zellen im Kleinhinmark.

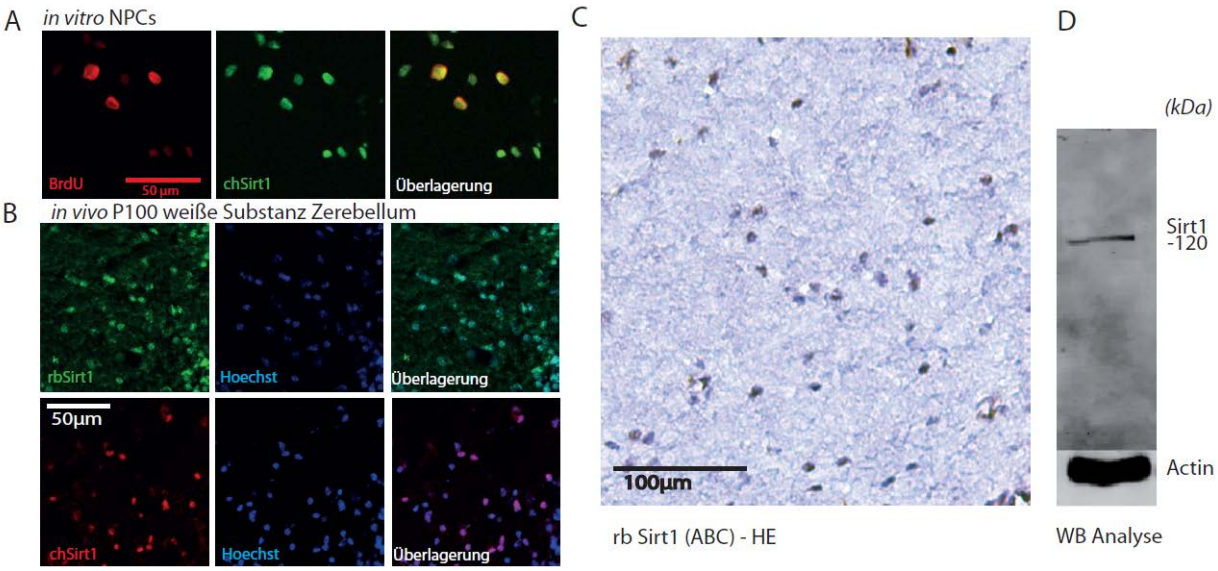


Abbildung 9: **Der neue chSirt1 Antikörper** *A. zeigt eine nukleäre Expression des Sirt1 in NVZ in vitro B: Vergleich mit dem kommerziellen rbSirt1 AK (Cell Signaling), beide 1:100 in der ICC/IHC. Es zeigt sich bei beiden AK das gleiche Muster an gefärbten Zellen im Kleinhirnmark C: rbSirt1 mit der ABC Färbemethode (2.10.4): auch hier zeigen sich die Zellen im Kleinhirnmark Sirt1+ positiv D: zu erwartende Bande bei 120 kDA im Western Blot, totales Zelllysat aus dem Kleinhirn.*

2.11 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse

Bei diesem Mausstamm wurde ein konditioneller Knockout des Exons 4 durchgeführt, das für 51 Aminosäuren aus dem katalytischen Zentrum des Sirt1 Proteins kodiert. So ist das Sirt1 Protein noch vorhanden und kann zum Beispiel auch in homozygoten Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Tieren in der Immunfluoreszenz mit einem N-terminalen AK detektiert werden. Allerdings ist das katalytische Zentrum nicht funktionell. Die Mäuse (129Sv.129Sv(C57BL/6)-SIRT1tm) wurden auf C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt. Der homozygote Phänotyp ist auf Grund kardialer und neuronaler Entwicklungsfehler zu über 90 % postnatal letal, wenngleich er bis in die späten embryonalen Stadien den Mendel'schen Regeln entsprechend vorhanden ist (41;157). Deshalb konnten zur Analyse postnataler beziehungsweise gealterter Mäuse nur die Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Tiere genutzt werden.

Der homozygote Phänotyp kann in pränatalen Stadien analysiert werden, doch auch bei uns zeigten sich die beschriebenen Entwicklungsstörungen wie eine gelegentliche Exenzephalie,

retinale Abnormalitäten und ein geringeres Gewicht verbunden mit kleinerer Größe (41;157). Wir danken Frederick W. Alt und Yuko Fujiwara (*Children's Hospital, Harvard Medical School* und *Howard Hughes Medical Institute*, Boston) für die Bereitstellung der Sirt1 ex4/ex4 Maus-Zuchtpaare.

2.12 Sox10-EGFP Reporter Mäuse

Diese Mauslinie exprimiert GFP (grün fluoreszierendes Protein) in allen Sox10+ positiven Zellen und kann so als Reporterlinie für alle Oligodendrozyten genutzt werden. Sie wurde freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Carmen Birchmeier (Gruppenleiter Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie/Signaltransduktion in Nerven und Muskelzellen, MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.13 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) kann entweder aktiv mittels Myelin-Antigenen in Freund Adjuvans oder passiv mittels Transfer aktivierter Myelin-spezifischer T-Zellen, die in naive Empfänger-Mäuse transferiert werden, induziert werden. Die Immunisierung der verschiedenen Mausstämme erfordert ein jeweils angepasstes Protokoll. Grundsätzlich dürfen die Tiere erst nach einer Akklimatisierungsphase von mindestens zwei Wochen behandelt werden. Alle Versuche erfolgten gemäß genehmigtem Tierversuchsantrag (Aktenzeichen des Genehmigungsverfahrens vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV): 8.87-50.3709197, Aktenzeichen der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität: G 197/09). Ein Fachkundenachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes der Doktorandin liegt vor vom 11.09.2009 aus Düsseldorf.

2.13.1 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis - Aktive Immunisierung

Bei MOG-Immunisierung im C57 BL/6 Mausstamm, der in der aktiven EAE für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, resultiert ein chronischer Krankheitstyp mit moderater Krankheitsaktivität. Die verwendeten Tiere waren alle ziemlich genau 13 Wochen alt.

Das Immunisat bestand je Tier aus 200 - 300 µg $MOG_{35–55}$ Peptid und 800 µg H37RA (Mycobakterium) in 100 µl steriler PBS Lösung und zusätzlich 100 µl Komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA). Pro Maus wurden am Tag der Immunisierung (Tag 0) insgesamt 200 µl Emulsion subkutan injiziert. Dies erfolgte mit jeweils 50 µl an vier Stellen des Rumpfes im Übergang zu Vorder- und Hinterläufen ohne die Tiere durch die entstehenden Beulen in ihrem Bewegungsablauf zu stören. Gleichzeitig wurden die Mäuse durch eine Ohrstanze markiert und 400 ng Pertussistoxin zur Induzierung einer stärkeren Immunantwort intraperitoneal injiziert. Außerdem wurden die Tiere gewogen, um für das

folgende tägliche Scoring einen Ausgangswert zu erhalten. An Tag zwei erfolgte eine erneute Pertussistoxin Injektion.

2.13.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis - Passive Immunisierung

Hier erfolgt die Beschreibung der SJL/J Immunisierung, da dieser Mausstamm in der passiven EAE für die vorliegende Arbeit verwendet wurde. Bei PLP-Immunisierung in SJL/J Mäusen resultiert ein schubförmig remittierender Krankheitsverlauf mit schwerer Krankheitsaktivität.

Für die passive EAE müssen zunächst aktivierte Myelin-spezifische T-Zellen generiert werden, die dann in naive Mäuse transferiert werden. Hierzu erfolgte die Immunisierung der sechs Wochen alten, circa 16 Gramm schweren SJL/J-Spendermäuse gemäß dem obigen Protokoll der aktiven Immunisierung an Tag 0, jedoch ohne Pertussistoxin-Injektion. Zehn Tage später wurden die drainierenden Lymphknoten (inguinal, axillär) und separat die Milz unter Isoflurannarkose nach Einsetzen der Apnoephase isoliert, durch ein 70 µm Sieb gefiltert und mit DMEM+P/S (Waschmedium) gewaschen. Um aus den isolierten Organen eine mononukleäre Zellsuspension herzustellen, wurden diese bei 300 g für zehn Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet für drei Minuten bei Raumtemperatur in Ammonium-Chlorid resuspendiert, wodurch die Erythrozyten lysierten. Abgestillt durch Waschmedium erfolgte eine erneute Zentrifugation für zehn Minuten bei 300 g. Abschließend wurden die Zellen in kompletten Kulturmedium resuspendiert, das aus RPMI, Penicillin/Streptomycin, Glutamax, 2-Mercaptoethanol, 10 Prozent FCS und nicht-essentiellen Aminosäuren bestand. Durch Zugabe von Myelinprotein (10 µg/ml) wurde die Proliferation der Myelin spezifischen T-Zellen stimuliert. Bei 37°C wurden die Kulturflaschen mit einer Zellkonzentration von $4x10^6$/ml für 96 Stunden in einem fünfprozentigen CO_2 Inkubator inkubiert. Dann erfolgte die Ernte, eine erneute Zenrifugation bei 300 g für zehn Minuten und eine Resuspension in Waschmedium, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. In 200 µl eiskaltem PBS aufgelöst, wurden dann jedem Empfängertier 30 Millionen Zellen intraperitoneal appliziert.

2.13.3 Scoring der Tiere

Im Verlauf einer EAE wurden die Tiere täglich klinisch untersucht und gewogen, um klinische Auffälligkeiten zu dokumentieren. Zuerst wurde die Identität (Ohrstanzen) überprüft und das Gewicht erfasst, da eine Gewichtsabnahme auf eine Krankheitsaktivität hindeutet. Durch verschiedene klinische Tests, wie zum Beispiel Hochnehmen, Gitterlauf und auf den Rücken drehen, konnten sowohl Lähmungen des Schwanzes und der Vorder- beziehungsweise Hinterbeine als auch komplexere Störungen der Bewegungsabläufe erfasst werden. Durch das innerhalb der Arbeitsgruppe standardisierte Scoring konnten Daten objektiv gesammelt

und anschließend in ein Zahlensystem übertragen werden (Tabelle 10). Ein Symptom in Klammern bedeutete immer, dass das entsprechende Zeichen nicht vollständig ausgeprägt war.

Tabelle 10: *Scoring Schema der Arbeitsgruppe*

Abkürzung	**Bedeutung**	**Zahl**
	keine Auffälligkeiten	0
(TPA)	t*ail paresis* (inkomplette Schwanzlähmung)	0,25
(RRW)	*rightning reflex weak* (Zurückdrehreflex schwach)	0,25
TPA		0,5
RRW		0,5
TPA-TPL	Übergang zur vollständigen Lähmung	0,75
TPL	*tail plegia* (vollständige Schwanzlähmung)	1,0
TPL + (HPA)	*hind limb paresis* (unvollständige Hinterbeinlähmung)	1,25
TPA-TPL + RRW		1,25
TPL + HPA		1,5
TPL + RRW		1,5
TPL + (HPA) + RRW		1,75
TPL + HPA + (RRW)		1,75
TPL + HPA + RRW		2,0
TPL + HPA + (FPA) + RRW	*fore limb paresis* (inkomplette Vorderbeinlähmung)	2,5
TPL + HPA + FPA + RRW		2,5
TPL + HPA/HPL + RRW		2,5
TPL + HPL + RRW		3,0
TPL + HPL + (FPA) + RRW		3,5
TPL + HPL + FPA + RRW		4,0
TPL + HPL + FPL /moribund	*fore limb plegia* (vollständige Vorderbeinlähmung)	4,5
day after death	Tag nach dem Tod	5,0

2.14 Verwendete Software

Folgende Softwareprogramme oder Pakete wurden verwendet:

Microsoft Office Paket (2003), Adobe Photoshop CS5, Adobe Acrobat 8 Professional, Adobe Illustrator CS5, Reference Manager.

3 Ergebnisse

3.1 Lokale Expressionsmuster von Sirt1 im ZNS der Maus – Veränderung im Alter

3.1.1 Sirt1 in Keimzellregionen der adulten Maus – Immunhistologie

Dieser Teil der Arbeit hatte zum Ziel, zunächst mittels Immunfluoreszenzfärbungen herauszufinden, welche Zellen im adulten ZNS der gesunden Maus Sirt1 exprimieren. Dazu wurden die Gehirne der im Schnitt drei Monate alten weiblichen C57B6 Mäuse gemäß der im Methodenteil genannten Abläufe isoliert, kryokonserviert und zu circa 12 µm dicken Schnitten verarbeitet (2.10.1). Anschließend erfolgte eine immunhistologische Färbung erst mit den gewünschten primären, dann fluoreszierenden Sekundärantikörpern (2.10.2). Diese Schnitte konnten dann unter dem Fluoreszenzmikroskop in ihren verschiedenen germinativen Regionen, der subventrikulären Zone (1.6.1) und der subgranularen Zone (1.6.2) in der Hippocampusformation, untersucht werden.

Grundsätzlich waren in der SVZ viele Zellen positiv für Sirt1 (Abbildung 10). In der SGZ hingegen fanden sich ebenfalls einige Sirt1+ positive Zellen, die große Masse der Neuronen im Gyrus dentatus dagegen zeigte kein positives Signal. Es folgten Doppelfärbungen mit verschiedenen Zellmarkern, um die Zelltypen, die Sirt1 exprimieren, genauer zu bestimmen.

Zunächst fand sich Sirt1 in neuroepithelialen Stammzellen vor allem in der SVZ, aber auch vereinzelt in der SGZ (Sirt1+/Nestin+ doppelt positive Zellen in Abbildung 10 A).

Des Weiteren konnte die gemeinsame Expression von Sirt1 und Sox2, einem weiteren Stammzellmarker (siehe 1.5.2) gezeigt werden. Diese doppelt positiven Zellen fanden sich in der SGZ, aber auch inmitten des Hilusbereiches der Hippocampusformation, vor allem in der Nähe zu kleinen Gefäßen (Teil B). In der SVZ waren viele Zellkerne positiv für Sox2.

Eine deutliche Kolokalisation fand sich auch für Sirt1 und GFAP (Teil C). Die Sirt1+/GFAP+ doppelt positiven Zellen fanden sich vor allem in der SGZ, vereinzelt aber auch inmitten des Hilus. In der SVZ lagen die Sirt1+/GFAP+ doppelt positiven Zellen vor allem in der Nähe von Gefäßen direkt unterhalb der Ependymzellen.

Interessanterweise zeigte sich Sirt1 ebenfalls in Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (Teil D). Die Sirt1+/PDGFRα+ doppelt positiven Zellen fanden sich vor allem in der SGZ, in größerer Anzahl aber auch inmitten des Hilus. In der SVZ lagen die Sirt1+/ PDGFRα + doppelt positiven Zellen eher nicht nur direkt unterhalb der Ependymzellen, sondern etwas weiter entfernt.

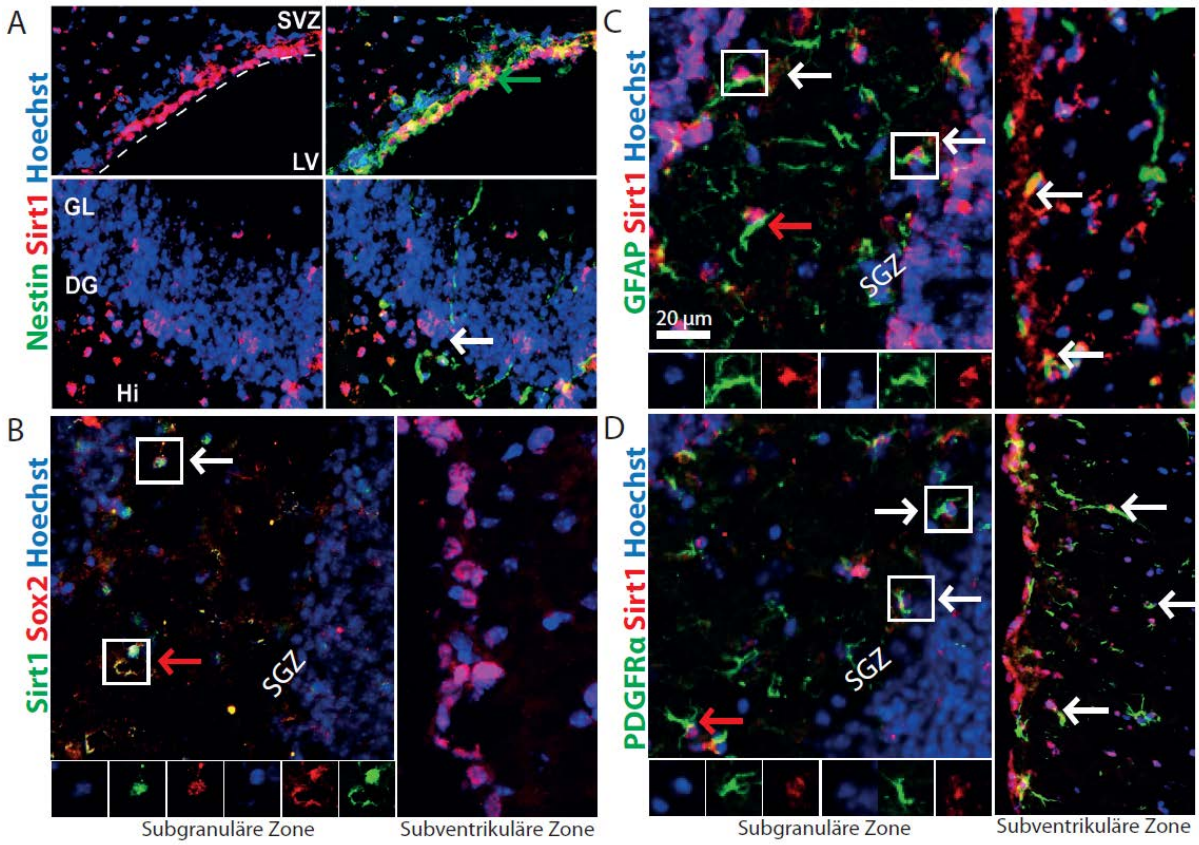


Abbildung 10: Sirt1 Expression in den Keimzellregionen der adulten Maus A: Sirt1+/Nestin+ *doppelt positive Zellen in der SVZ (grüner Pfeil) und SGZ (weißer Pfeil)* ***B: Sirt1+/Sox2+*** *doppelt positive Zelle in der SGZ (weißer Pfeil), aber auch inmitten des Hilus (roter Pfeil). In der SVZ sind viele Zellen positiv für Sox2* ***C: Sirt1+/GFAP+*** *doppelt positive Zellen vor allem in der SGZ (weiße Pfeile), aber auch inmitten des Hilus (roter Pfeil) und in der SVZ (weiße Pfeile)* ***D: Sirt1+/ PDGFRα +*** *doppelt positive Zellen in der SGZ (weiße Pfeile), aber auch inmitten des Hilus (roter Pfeil). In der SVZ vor allem weiter von den Ependymzellen entfernt (weiße Pfeile). Jeweils repräsentative Bilder aus mindestens drei verschiedenen Schnitten und drei verschiedenen adulten Mäusen P350.*

3.1.2 Sirt1 in Gliazellen des Kleinhirns– Immunhistologie

Da nach den Ergebnissen aus 3.1.1 der Hinweis auf eine Expression von Sirt1 in OVZ bestand, zielte diese nächste immunhistologische Färbungsreihe auf eine genauere Analyse derselben ab. OVZ machen fünf bis acht Prozent aller Gliazellen aus und verteilen sich über das ganze Gehirn. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das Kleinhirn gewählt, das in seinem Mark viele OVZ enthält. In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass das Kleinhirn aus einer dreischichtigen Rinde mit der Molekularschicht (1), gefolgt von der Purkinje–Zellschicht (2) und angrenzend an das Mark der dicht gepackten Körnerzellschicht (3) besteht. Hier zeigte sich eine geringe Reaktivität unseres Antikörpers, aber keine nukleäre Kolokalisation. Im innenliegenden Mark (4), das hauptsächlich aus Axonen mit Myelinscheiden (MBP) und den umgebenden Gliazellen besteht, fand sich die typische Anordnung der reifen Myelin-produzierenden Oligodendrozyten: die meist dreigliedrigen „Perlenketten“ (Abbildung 11 A). Diese „Perlenketten“ waren deutlich positiv für Sirt1 und auch positiv für den *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor Olig2, der hier als Marker für Oligodendrozyten genutzt wurde. Aus

Abbildung 11 B ist ersichtlich, dass sich viele dieser Sirt1+/Olig2+ doppelt positiven Zellen im Mark finden ließen, aber auch Sirt1-/Olig2- doppelt negative Zellen vorhanden waren. Eine Quantifizierung ergab (Abbildung 11 E1), dass fast 70 % aller Olig2+ positiven Zellen auch positiv für Sirt1 waren.

Um diese Sirt1+/Olig2+ doppelt positiven Zellen genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene Dreifachfärbungen angefertigt. Knapp 90 % dieser Sirt1+/Olig2+ doppelt positiven Zellen waren auch Sox10+ positiv und damit eindeutig der Oligodendrozytenlinie zuzuordnen (Abbildung 11 C und E3). Allerdings waren nur etwas mehr als 50 % aller Sox10+ positiven Zellen auch positiv für Sirt1 (E2).

Vereinzelt im Übergang von Mark zu Körnerzellschicht fanden sich auch GFAP+/Sirt1+/Olig2+ dreifach positive Zellen (Abbildung 11 D). Außerdem wurde Sirt1 auch in zehn Prozent der NG2+ beziehungsweise PDGFRα+ positiven Zellen im Kleinhirnmark exprimiert (siehe auch Abbildung 25) und somit in OVZ.

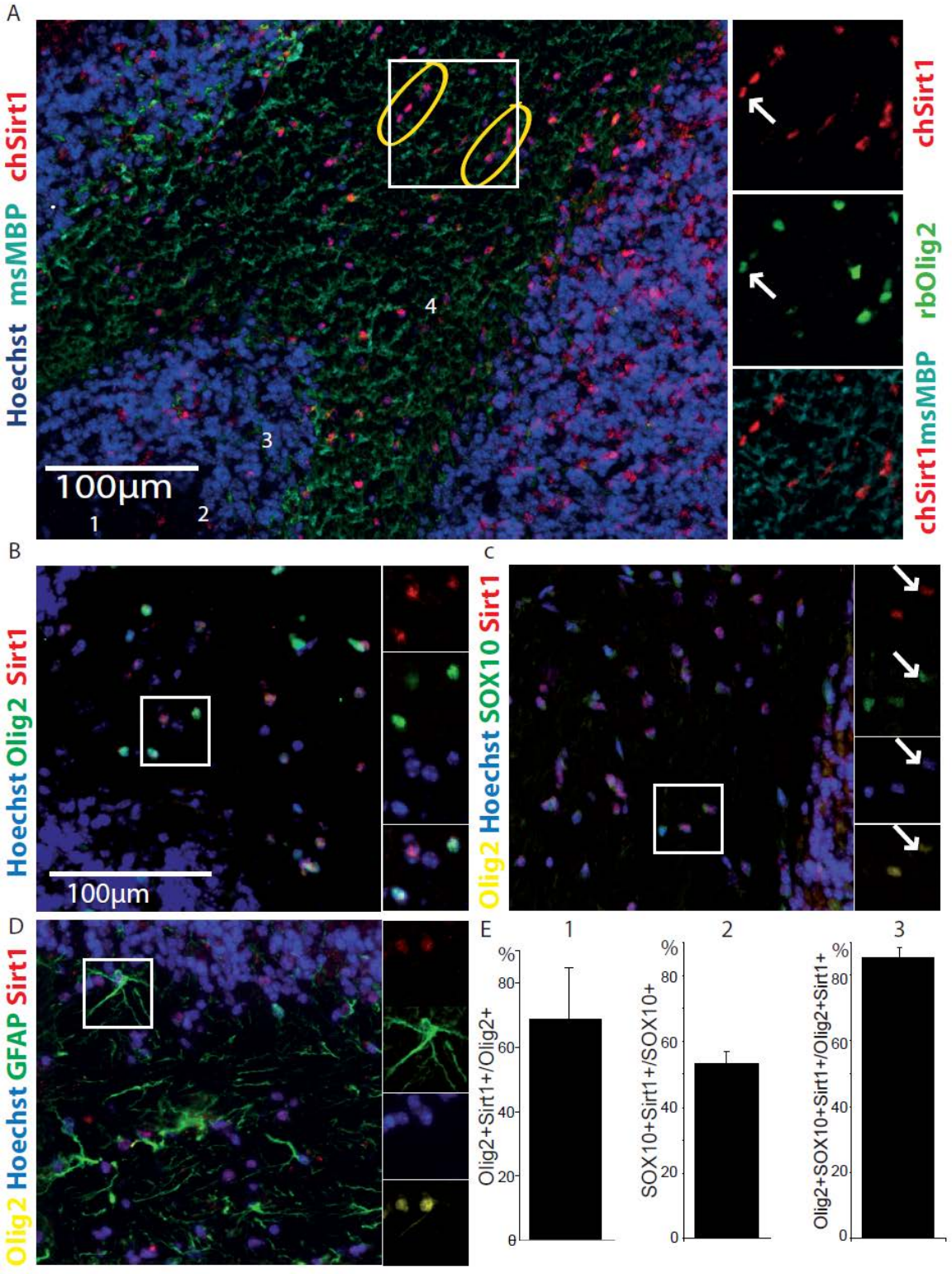


Abbildung 11: Sirt1 in Oligodendrozyten in der weißen Substanz des Kleinhirns - IHC
A: typische Anordnung der reifen Oligodendrozyten *in meist dreigliedrigen „Perlenketten" inmitten des Markes. Diese sind deutlich Sirt1+ positiv und fast alle Sirt1+/Olig2+ doppelt positiv.* Zonen des Kleinhirns: *Molekularschicht (1), Purkinje-Zellschicht (2), Körnerzellschicht (3) und Mark (4)* **B:** *Es gibt auch Zellen im Mark, die Sirt1-/Olig2- doppelt negativ sind.* **C:** *Sirt1+/Olig2+ doppelt positive Zellen sind zumeist auch Sox10+ positiv, also dreifach gefärbt.* **D:** *Vereinzelt finden sich auch Sirt1+/Olig2+ doppelt positive Zellen, die GFAP exprimieren.* **E: Quantifizierung der IHC***: Methode siehe 2.10.3. MW±SEM von jeweils repräsentativen Bildern aus mindestens drei verschiedenen Schnitten und drei verschiedenen Mäusen.*

Die Gesamtheit aller Sirt1 positiven Zellen im Mark des Kleinhirns setzte sich wie in Abbildung 12 zu sehen hauptsächlich aus Gliazellen zusammen.
Von allen Sirt1+ positiven Zellen waren zehn Prozent der Sirt1+ positiven Zellen PDGFRα+ positiv, wobei bekannt ist, dass alle NG2+ positiven Zellen auch positiv für PDGFRα sind (124). Ebenfalls gab es zehn Prozent GFAP+ positive Zellen, wobei hier circa ein Prozent GFAP+/Olig2+/Sirt1+ dreifach positive Zellen gefunden wurden.

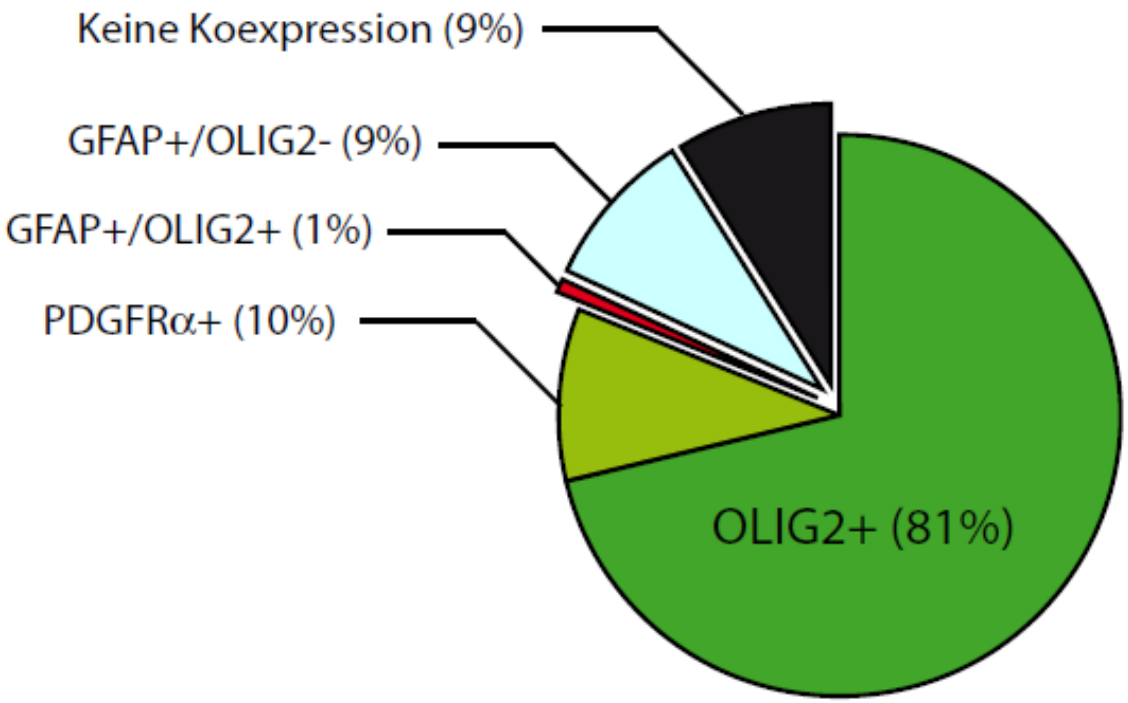


Abbildung 12: Sirt1+ Zellen im Mark des Kleinhirns. *Diese Abbildung zeigt die Zusammensetzung aller Sirt1+ positiven Zellen im Mark des Kleinhirns. Alle Angaben zur Quantifizierung stammen von mindestens drei Aufnahmen pro Schicht aus drei verschiedenen Schichten von drei verschiedenen weiblichen adulten gesunden Mäusen. Genauere Angaben zur Quantifizierung finden sich in 2.10.3.*

3.1.3 Erhöhte Sirt1 RNA-Expression im Alter - *in vitro* und *in vivo*

Um herauszufinden, ob sich die Expression der Sirtuine mit dem Alter verändert, wurde in diesem Teil der Arbeit zunächst eine Analyse der RNA-Expression während des Differenzierungsprozesses zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in alternden NVZ durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in 2.9.1 beschrieben.
Die Ergebnisse der RNA Isolation sind im Anhang A zu finden. Das Expressionslevel von Sirt1 in den gealterten NVZ war generell erhöht, ebenso das von Sirt5 und PARP1. Sirt2 und Sirt3 hingegen zeigten in jungen und gealterten NPCs die gleiche Tendenz: Je länger die Zellen in Differenzierungsmedium gehalten wurden, desto höher war die Expression auf RNA Level. In der Abbildung 13 Teil A ist die Sirt1 Expression der frühen Zellen von allen Differenzierungsstufen kombiniert den gealterten Zellen gegenübergestellt, hier war die höhere Expression in den gealterten NVZ signifikant.

Um herauszufinden, ob die *in vitro* beobachtete Hochregulation von Sirt1 im Alter auch im ZNS in *vivo* zu sehen ist, wurden einzelne Hirnregionen von gesunden weiblichen C57B6 Mäusen verschiedenen Alters isoliert und die Sirt1 RNA-Expression mittels quantitativer PCR getestet. Aus der Abbildung 13 Teil B wird ersichtlich, dass die Sirt1 Expression anstieg, je älter das entsprechende Tier war. Die höchste Expressionsrate fand sich im Kleinhirn im Alter von 350 Tagen. Im Gegensatz zu der Expressionsrate im Alter von fünf und 110 Tagen war dies eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der Expression im Kleinhirn. Ebenfalls signifikant erhöht war die Expressionsrate in den Kortices im Alter von 350 Tagen in Relation zu den fünf-Tage-alten Tieren. In den subcortikalen Arealen zeigte sich die gleiche Tendenz, allerdings fanden sich hier keine p Werte < 0,05.

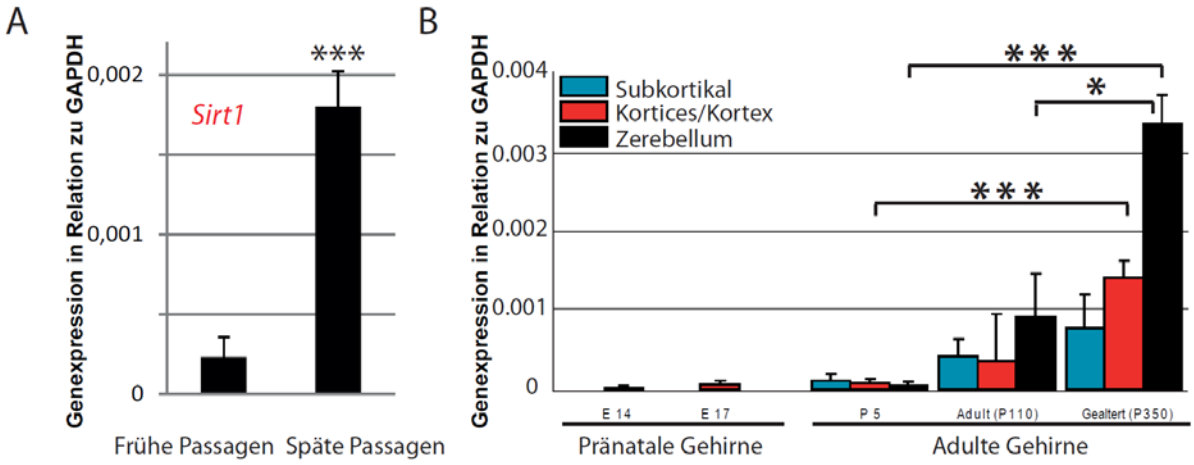


Abbildung 13: Sirt1 Expression im Alter, in vitro und in vivo. A: Sirt1 RNA-Expression *(y-Achse) in frühen und späten (gealterten) Passagen der NVZ in vitro.* ***B: Sirt1 RNA-Expression im alternden Mausgehirn*** *RNA-Expression von Sirt1 in Relation zu dem housekeeping Gen GAPDH auf der y-Achse, die x-Achse zeigt die verschiedenen Altersstufen (E14, E17, P5, P110 ♀ und P350 ♀) jeweils unterteilt in die subkortikale Region (mit Gyrus dentatus und SVZ), die Kortices und das Zerebellum des gesunden Mausgehirns (je n3), (Mittelwert ± SEM) t-test: *p-Werte < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005.*

3.2 Analyse von Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Tieren und Zellen

Da der vollständige Funktionsverlust von Sirt1 in Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse (konditioneller Knockout des katalytischen Zentrums *(129Sv.129Sv (C57BL/6)-SIRT1tm))* pränatal oder früh postnatal letal ist (41;157), wurden in diesem Teil der Arbeit zunächst heterozygote adulte Tiere genutzt, um die Keimzellregionen auf Veränderungen der Marker der Oligodendrozyten-entwicklung im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern hin zu untersuchen.

3.2.1 Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Tiere – Korrelation von Sirt1 und Sox10/ Sox9 in SVZ

Es erfolgte bei drei Monate alten Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Weibchen im Vergleich zum Wildtyp eine Analyse der RNA-Expression in der Region der Seitenventrikel inklusive SVZ, da dort frühe Vorläuferzellen vorhanden sind. Im Vergleich erfolgte die Isolation und Analyse aus Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Weibchen, die ein Jahr alt waren. Zusätzlich wurde hier noch das Kleinhirn analysiert, da dort im speziellen viele OVZ zu finden sind (3.1.2). In der Abbildung 14 Teil A ist ersichtlich, dass in drei Monate alten Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Mäusen eine signifikante Inhibition der Sox10 RNA-Expression um das 5,0fache im Gegensatz zum Wildtyp vorlag. Sox9 hatte die gleiche Tendenz, allerdings ohne Signifikanz. Da das nicht funktionelle Sirt1 mit der Primersequenz in der qRT-PCR ebenfalls detektiert werden kann, zeigte sich keine signifikante Veränderung der Sirt1 Expression. Für Mash1 war es umgekehrt, dort zeigte sich eine RNA Induktion, wenn auch ohne Signifikanz.

In Teil B bei den ein Jahr alten Tieren zeigten die schon im Teil A erwähnten Gene die gleiche Tendenz, wieder mit einer deutlichen signifikanten 4,3fachen Inhibition von Sox10. Bemerkenswert war vor allem die positive Korrelation der RNA-Expression, die zwischen Sox10/Sox9 und Sirt1 beobachtet werden konnte, egal ob Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ oder Wildtyptiere betrachtet wurden: Je höher der gemessene Sirt1 Wert, desto größer war auch die Sox10 Expression (r = 0,95 Abbildung 14 Teil C). Ebenso sah es bei Sox9 aus (r = 0,94 Abbildung 14 Teil D). Als Gegenbeispiel dient zum Beispiel Mash1 (r = -0,53, ohne Abbildung). Auf der x-Achse ist jeweils die Sirt1 RNA-Expression ± SEM aufgetragen, im Verhältnis zu der RNA-Expression ± SEM von Sox9/10 auf der y-Achse, immer in Relation zum *housekeeping* Gen GAPDH. In blau sind die Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ und in rot die Wildtypeinzeltiere markiert.

Im Kleinhirn zeigte sich eine signifikante Induktion von Sox9 um 5,3 in den ein Jahr alten Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Tieren in Relation zum Wildtyp (Abbildung 14 Teil E). Sox10, Olig2 und GFAP zeigen ebenfalls eine Induktion um das zwei- bis Dreifache allerdings ohne Signifikanz. Gleiches gilt für DM20 und PLP, die tendentiell inhibiert werden.

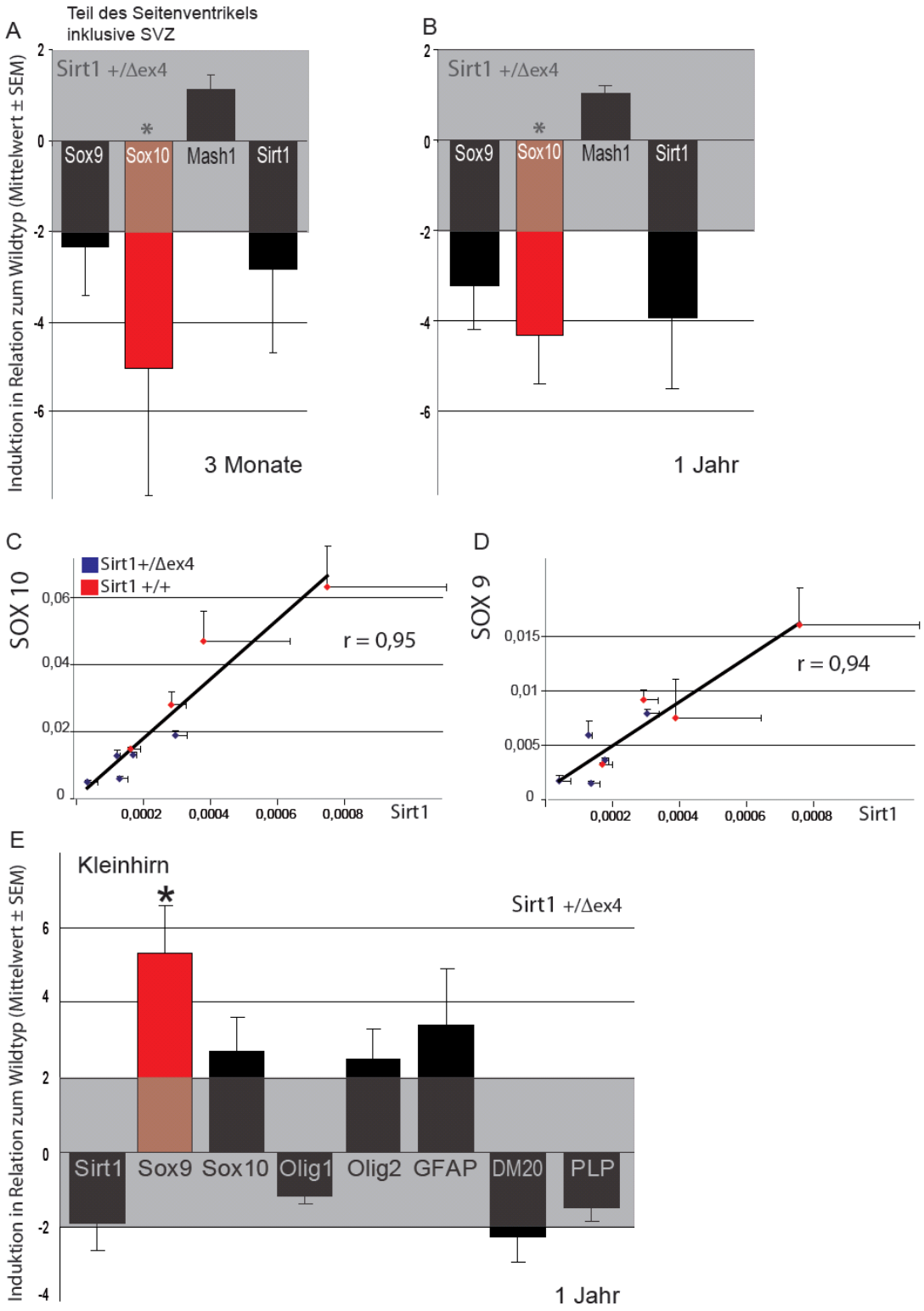


Abbildung 14: RNA-Expression bei Sirt1$^{+/\Delta ex4}$ Mäusen in der Region der Seitenventrikel, inklusive SVZ *im Alter von drei Monaten* **(A)** *und einem Jahr* **(B),** *qRT-PCR Analyse, berechnet ist die Induktion / Inhibition der Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Tiere (n4) in Relation zum Wildtyp (n4)* **C/D:** *Korrelation der Sox10/Sox9 Expression (qRT-PCR) mit der Sirt1 Expression in der SVZ bei ein Jahr alten Mäusen (n=9). In rot sind die Wildtyp Tiere (n=4), in blau die Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Tiere (n=5) markiert. Die Werte auf der x- und y- Achse sind in Relation zu dem Housekeeping Gen GAPDH berechnet.* **E: RNA-Expression bei Sirt1$^{+/\Delta ex4}$ Mäusen im Kleinhirn** *im Alter von einem Jahr, qRT-PCR Analyse, berechnet ist die Induktion / Inhibition der Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Tiere (n=4) in Relation zum Wildtyp (n=4) (Mittelwert ± SEM) p-Werte < 0,05*

3.2.2 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ *in vivo* – Einfluss auf undifferenzierte multipotente Stammzellen und die embryonale Oligodendrozytenentwicklung

Das genaue Muster der neuralen Vorläuferzellen in diesen Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäusen ist nicht bekannt, deswegen soll zunächst die Expression von neuralen und glialen Markern im embryonalen Gehirn mit Wildtyp-Geschwistern verglichen werden.

Durch die Analyse der SVZ und des Kleinhirnes in Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Mäusen aus dem vorangehenden Arbeitsteil ist bekannt, dass Sirt1 einen Einfluss auf die Expression von Sox9 und Sox10 hatte. Daher stellte sich vor allem die Frage, wie sich das Fehlen eines funktionellen Sirt1-Proteins auf die Oligodendrozytenentwicklung auswirken würde. Da Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ bei unserem genetischen Hintergrund früh postnatal letal ist, wurden Sirtt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen im Alter von E16 auf Expression von Oligodendrozytenmarkern untersucht und mit Wildtyp-Geschwistern verglichen.

Dazu wurden E16 Embryonen aus der heterozygoten narkotisierten Mutter isoliert, genotypisiert und anschließend gemäß 2.10.1 für die indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet und koronar geschnitten. Abbildung 15 zeigt, dass der äußerliche Phänotyp der E16 Embryonen außer mit der Größe nicht wesentlich vom Wildtyp abwich, wenn auch eine gelegentliche Exenzephalie bei den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen beobachtet werden konnte, deren gelegentliches Auftreten auch in der Literatur beschrieben ist (41). Wie in Abbildung 16 zu sehen, stellten sich auch die verschiedenen anatomischen Strukturen des embryonalen Gehirns identisch dar. Die Bilder zeigen in koronarer Schnittführung ein exemplarisches Gehirn eines E16 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mausembryos im Vergleich zum Wildtyp. Die Reihenfolge der Bilder ist von rostral nach dorsal und die angegebenen Ziffern erklären anatomische Eckpunkte des embryonalen Gehirns.

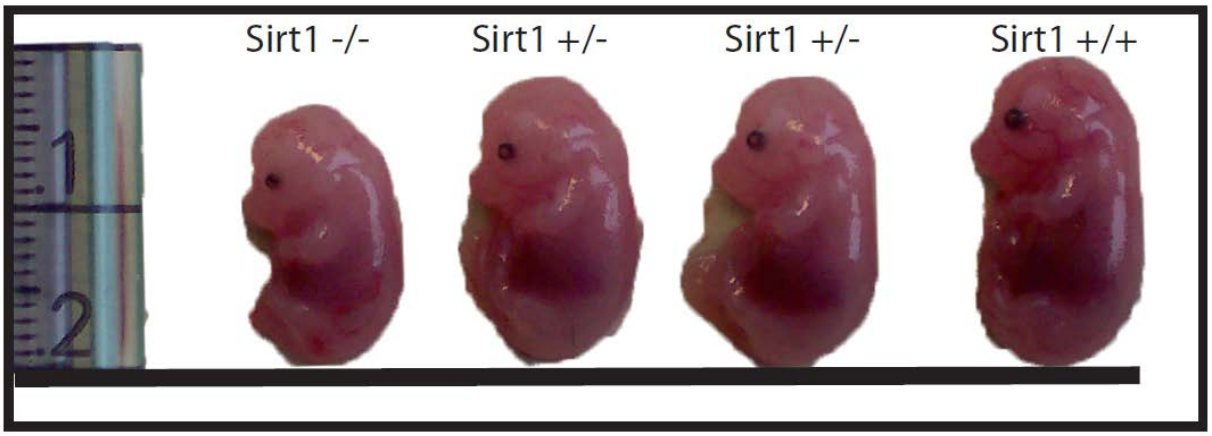


Abbildung 15: *Die Sirt1 Embryonen im Vergleich*

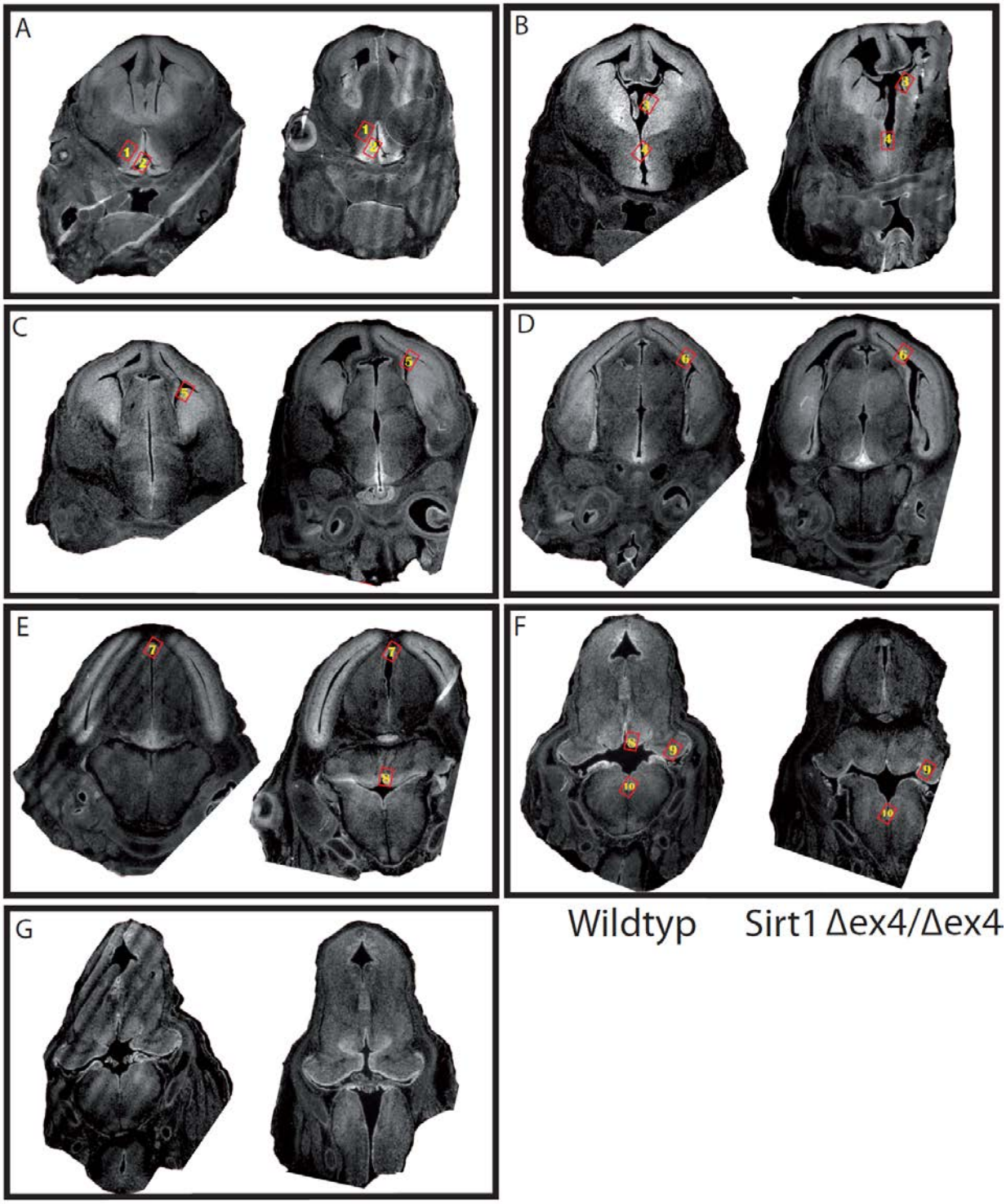


Abbildung 16: Wildtyp- und $^{Sirt1\Delta ex4/\Delta ex4}$-ZNS im Vergleich: *E 16 koronar, 1: periventrikuläres Gewebe des dritten Ventrikels, 2: anteriorer Ausläufer des dritten Ventrikels, 3: subependymale Zone des linken Foramen interventrikulare, 4: dritter Ventrikel, 5: linker Seitenventrikel, 6: Hinterhorn des linken Seitenventrikels, 7: Ventrikel des Mittelhirns (später Aquaeductus cerebri), 8: rostraler Anteil der zerebellären Anlage, 9: zerebelläre Anlage, 10: Übergang des vierten Ventrikel in den Zentralkanal des RM.*

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ und Kontrollwildtypen (n=3) zunächst für Sox2 (Marker für undifferenzierte embryonale Stammzellen) gefärbt. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass kein Unterschied in der Sox2 Expression gefunden werden konnte, weder in der SVZ noch in der zerebellären Anlage. Alle Sox2+ positiven Zellen fanden sich gleichmäßig um die Ventrikel, vor allem um den vierten (Abbildung 17 Bild 3) und den Ventrikel des Mittelhirns (später Aquaeductus cerebri, Abbildung 17 Bild 2). Zusätzlich fanden sich „Stammzellnester“ zum Beispiel lateral in der Nähe des infundibulären Ausläufers des dritten Ventrikels (Abbildung 17 Bild 1), die sich aber in Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ und den Kontrollwildtypen völlig gleich darstellten.

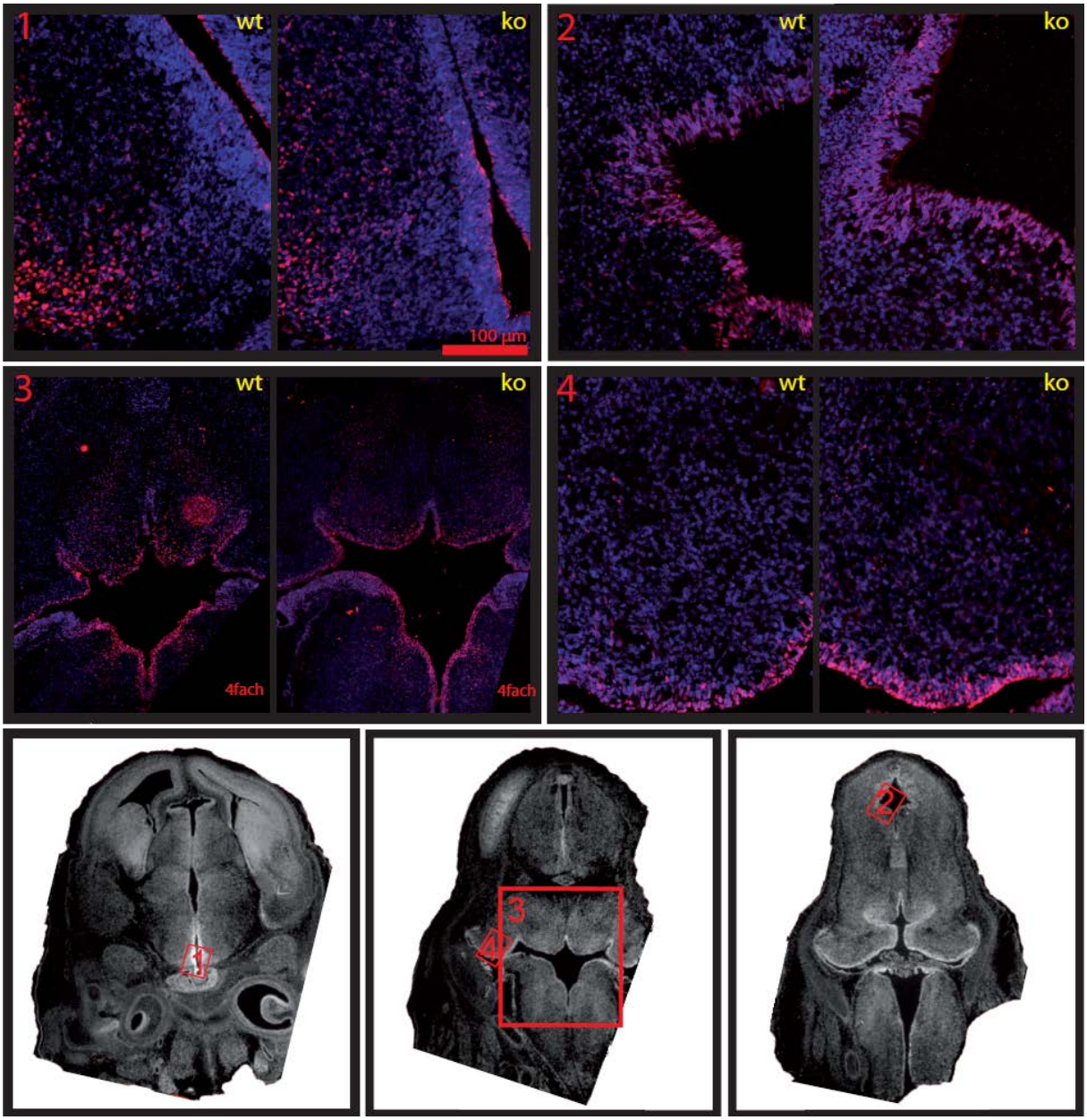


Abbildung 17: Sox2 *im Vergleich Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryos versus Wildtyp Embryos (E 16), 1: infundibulärer Ausläufer des dritten Ventrikels, 2: Ventrikel des Mittelhirns (später Aquaeductus cerebri), 3: Übersicht (4fach) vierter Ventrikel, 4: zerebelläre Anlage*

Um weiterhin die embryonale Oligodendrozytenentwicklung genauer zu untersuchen, erfolgten aus den isolierten E16 Gehirnen weitere Färbungen mit verschiedenen Markern der Oligodendrozyten. Die in der Abbildung 16 dargestellten Regionen der Wildtyp- und Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen wurden nun auf ihre Olig2 Proteinexpression hin untersucht und sind in Abbildung 18 dargestellt.

In beiden Fällen fanden sich Olig2+ positive Zellen am lateralen Ende des anterioren Ausläufers des dritten Ventrikels (Teil 2), in der subependymalen Zone des Foramen interventrikulare (Teil 3) und vereinzelt im periventrikulären Gewebe des dritten Ventrikels (Teil 1 und 4). Teil 5 zeigt den Bereich des linken Seitenventrikels. Hier fanden sich viele Olig2+ positive Zellen in der SVZ, diesmal mit leicht erhöhter Expression in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen. Im Gegensatz dazu fanden sich um das Hinterhorn des Seitenventrikels (Teil 6) und auch um den Ventrikel des Mittelhirnes (später Aquaeductus cerebri, Teil 7) in beiden Genotypen keine Olig2+ positiven Zellen. Interessant ist die Verteilung der Olig2+ positiven Zellen im Bereich der zerebellären Anlage. Im rostralen Anteil (Teil 8) fanden sich in beiden Genotypen Olig2+ positive Zellen einmal im Übergang der SVZ zum Parenchym und vereinzelt inmitten des Parenchyms. In der eigentlichen zerebellären Anlage (Teil 9) lagen die Zellen nicht in oder an der SVZ, sondern gruppiert inmitten der Anlage. Am Übergang des vierten Ventrikels in den Zentralkanal (Teil 10) lagen auch vereinzelte Olig2+ positive Zellen vor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine offensichtliche Störung der Olig2+ Zellentwicklung in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen vorlag, auch wenn vor allem in der SVZ des Seitenventrikels eine vermehrte Expression von Olig2 in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen beobachtet werden konnte.

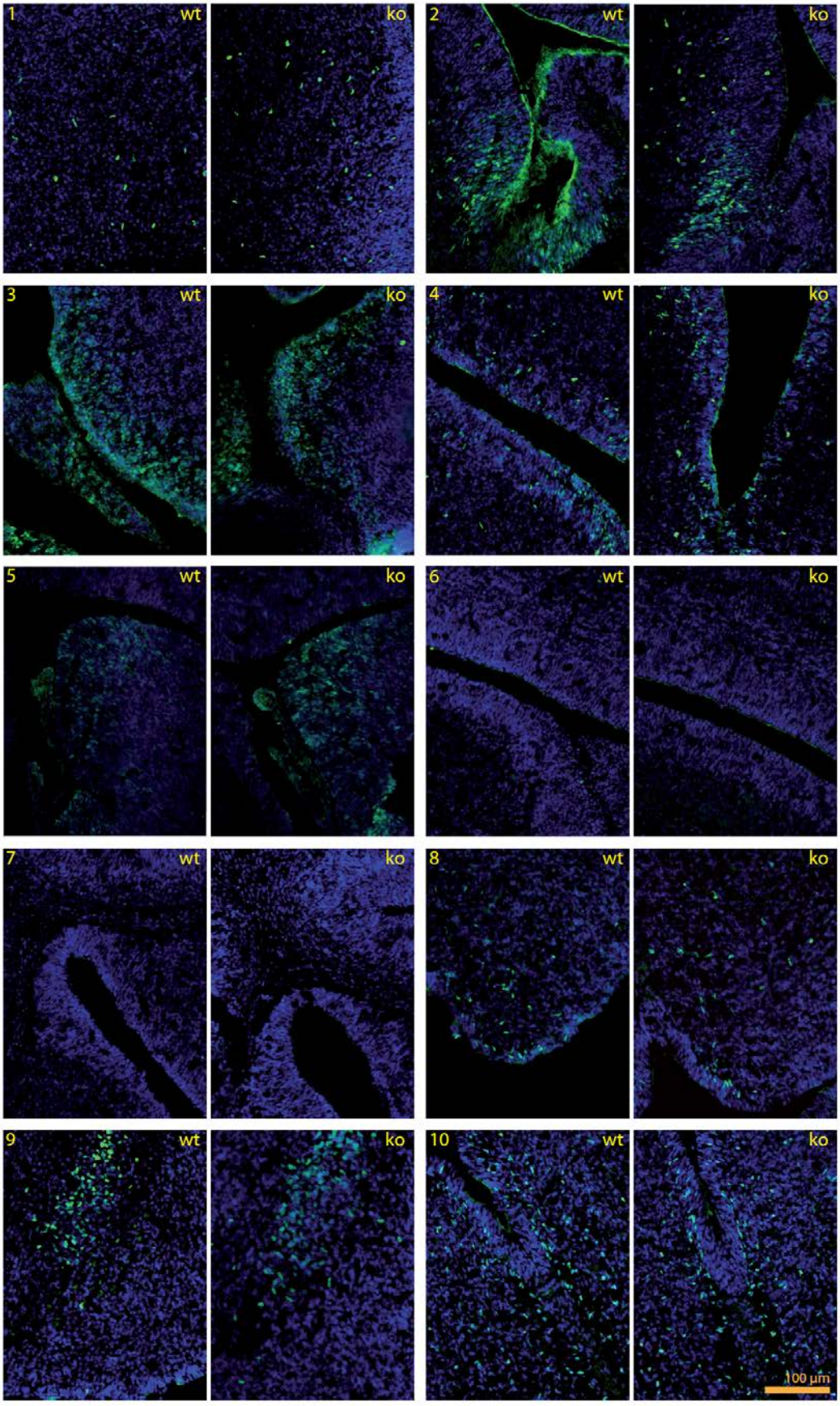


Abbildung 18: Olig2 *im Vergleich Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryos versus Wildtyp Embryos (E 16), Lokalisation der Ausschnitte in Abb. 16 dargestellt, Zahlen entsprechend; repräsentative Bilder aus je drei verschiedenen Embryonen, rbOlig2 Antikörper.*

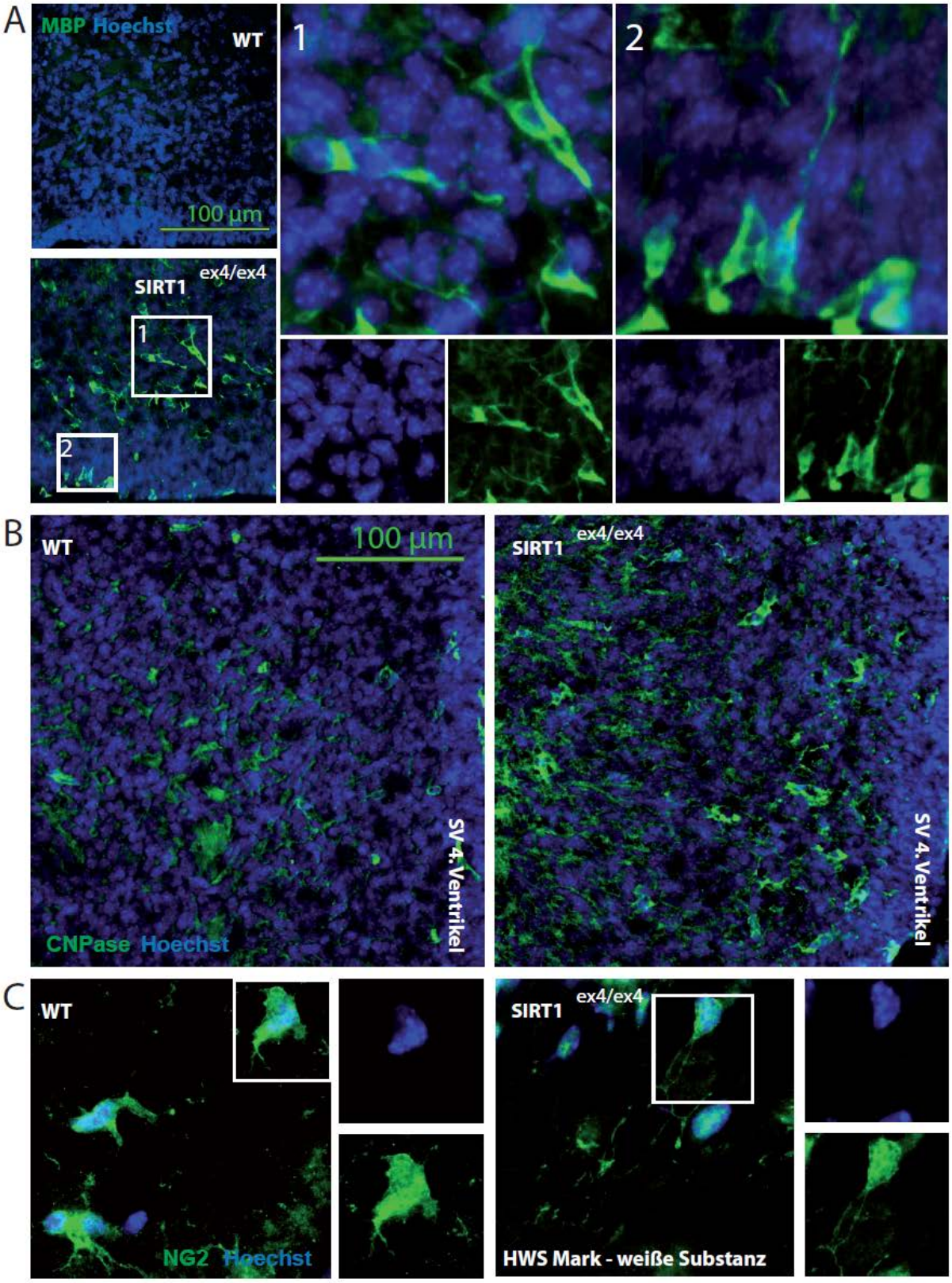


Abbildung 19: Myelinmarker im Vergleich. A: MBP *im Vergleich Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ versus Wildtyp (E 16): MBP+ positive Zellen fanden sich bei Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ in der SVZ (2) des vierten Ventrikels und auch inmitten der zerebellären Anlage (1)* **B: CNPase** *im Vergleich Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ versus Wildtyp (E 16),* **C: NG2** *als Marker für OVZ im Vergleich Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ versus Wildtyp (E 16)*

Die vorherig beschriebenen Regionen der Wildtyp- und Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen wurden nun auch auf ihre MBP Markerexpression hin untersucht. Es wurden jeweils mindestens drei verschiedene Embryonen aufgearbeitet und mit einem MBP Antikörper und Hoechst als Gegenfärbung in der indirekten Immunfluoreszenz gefärbt.

In den übrigen oben genannten Hirnregionen wurde kein Unterschied in der MBP Expression gefunden. Wie aus Abbildung 19 Teil A ersichtlich ist, fand sich in der zerebellären Anlage zumindest zweier der Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen eine verfrühte MBP Expression nahe des vierten Ventrikels, die in den Wildtyptieren nicht zu sehen war. Es gab MBP+ positive Zellen in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen in der SVZ (2) des vierten Ventrikels und auch inmitten der zerebellären Anlage (1). Diese vermehrte MBP Markerreaktivität war nicht mit Exencephalie der Tiere korreliert.

Ergänzend erfolgte eine Färbung für CNPase, das nur von reifen Oligodendrozyten exprimiert wird. In Teil B ist zu erkennen, dass CNPase bereits im Stadium E16 in beiden Genotypen exprimiert wurde, allerdings deutlich stärker in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen, besonders im Bereich des vierten Ventrikels.

NG2 ist ein Marker der Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (siehe 1.5.5). Dieser Marker wurde in beiden Genotypen der E16 Embryonen lediglich im Bereich des Halsmarkes in der weißen Substanz in einzelnen Zellen gefunden (Teil C). Ebenso fand sich kein Unterschied in der GFAP Protein Expression (IHC im Anhang B).

3.2.3 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ ex vivo – gesteigerte Differenzierung zu Oligodendrozyten

In den bisherigen Arbeitsteilen konnte gezeigt werden, dass Sirt1 einen Einfluss auf die Markerexpression der Oligodendrozytendifferenzierung in E16 Embryonen und die Genexpression der Oligodendrozytenlinie in adulten Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Mäusen hatte. In diesem Teil sollte der Effekt von Sirt1 in NVZ *ex vivo* bestätigt werden. Hierzu wurden NVZ aus Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$- und Wildtypgeschwistern (E17) isoliert (siehe 2.5.1), in Proliferationsmedium kultiviert und anschließend differenziert.

Die Zellen wurden als Screening in der qRT-PCR auf 22 verschiedene Transkriptionsfaktoren hin analysiert. Die Resultate finden sich Abbildung 20.

Vor allem die Inhibition von Zellzyklusinhibitoren (zum Beispiel p21 und PTEN) in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ war reproduzierbar. Für den Einfluss von Sirt1 auf die Oligodendrozytenentwicklung ist vor allem die starke Inhibition der Transkriptionsinhibitoren ID2 und Hes5 in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ (*fold change* 0.23) interessant, da diese normalerweise die Differenzierung zu reifen, Myelin produzierenden Oligodendrozyten unterdrücken. Im Gegensatz dazu zeigte der Transkriptionsfaktor Mash1, der bekanntermaßen die Oligodendrozytendifferenzierung aktiviert, eine reproduzierbare eindeutige Induktion (*fold change* 3.45).

Gene	Fold change der Sirt1 Δex4/Δex4 im Vergleich zum Wildtyp
GFAP	0,43
ID1	0,67
ID2	0,23
ID3	0,44
Sox9	0,76
Hes5	0,75
Olig1	0,94
Olig2	0,45
Sox10	1,81
p16	0,45
p19	0,44
p21	0,31
p27	1,10
PTEN	0,66
Sirt1	0,75
Sirt2	1,07
Sirt3	0,50
Sirt4	0,67
Sirt5	0,88
Sirt6	0,73
Sirt7	0,76
Mash1	3,45

Abbildung 20: Fold change der Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ im Vergleich zum Wildtyp in der Differenzierung. qRT-PCR Screening. *Die rot markierten Tendenzen konnten in unabhängigen Folgeexperimenten bestätigt werden. Die dreimal passagierten, auf Poly-L-Ornithin gezogenen NVZ wurden zu je 200.000 Zellen für drei Tage der Differenzierung ausgesetzt. weiß: keine Veränderung, hellgrün: Induktion > 2, dunkelgrün: Induktion > 4, pink: Inhibition < 0,5, magenta: Inhibition < 0,25*

Um diese Beeinflussung der Oligodendrozytenentwicklung auf RNA Ebene auch auf Proteinebene zu bestätigen, erfolgte eine Induktion der Differenzierung (siehe 2.9.3) in NVZ *in vitro*. In der IHC der NVZ zeigte sich zwischen den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ und den Wildtyp NVZ allerdings kein qualitativer Unterschied in der Olig2 Expression, das hier als Marker für Oligodendrozyten im Allgemeinen genutzt wurde. Ebenfalls zeigte sich kein Unterschied in der GFAP Expression (Anhang C).

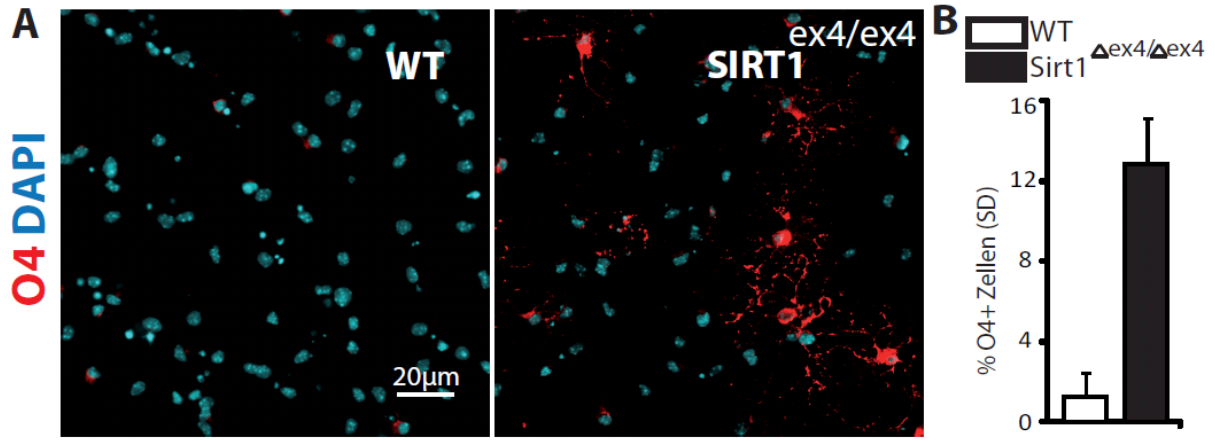


Abbildung 21: Sirt1 Aktivität ist nötig, um NVZ ex vivo in undifferenziertem Stadium zu halten
A: *Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ Kulturen aus E17 Kortices differenzierten früher in Richtung der Oligodenrozytenlinie. Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart der Wachstumsfaktoren bFGF (5 ng/ml)/EGF (5 ng/ml). Zur Differenzierung wurden die Zellen 5 Tage in Neurobasal-Medium, B27+, GTX und den Thyroidhormonen T3/T4 kultiviert, Analyse durch ICC* **B:** *zeigt den Prozentsatz an O4 Glykolipid+ positiven Zellen fünf Tage nach Beginn der Kultivierung (Mittelwert ± SD), Einzelexperiment, daher kann nicht statistisch getestet werden.*

Es konnte allerdings gezeigt werden, dass in Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ unter Oligodendrozyten induzierender Kondition eine verfrühte Expression des O4 Glykolipid Antigens auftrat (Abbildung 21 Teil A), das als einer der ersten Marker spezifisch Zellen der Oligodendrozytenlinie markiert. Abbildung 21 Teil B zeigt, dass fünf Tage nach dem Auftragen der Zellen nur circa ein Prozent der Wildtyp NVZ eine Expression des O4 Antigen zeigten, dahingegen sich knapp 13 Prozent der Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ positiv für das O4 Antigen färbten.

3.3 Sirt1 Expressionsmuster bei autoimmuner Demyelinisierung

Um die Multiple Sklerose (MS) zu erforschen, wird allgemein anerkannt das Mausmodell der MS, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) verwendet. Bisher wurde eine vermehrte Ausprägung von Sirt1 in EAE Mäusen in GFAP+ positiven Zellen (reaktive Astrogliose) beobachtet (5). In diesem Teil der Arbeit wurde die Ausprägung von Sirt1 in weiteren Zellen vor diesem entzündlichen Hintergrund analysiert. Der Fokus lag auf den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten, die im Zusammenhang der EAE und Sirt1 bisher nicht analysiert worden sind.

3.3.1 Induktion von Sirt1 auf RNA- und Proteinebene in der EAE im Kleinhirn

Zunächst erfolgte eine Analyse der Sirtuine und assoziierten Gene des NAD+ Metabolismus auf RNA Ebene bei EAE Mäusen im Kleinhirn. Die weiblichen ungefähr 13 Wochen alten Mäuse aus der Linie C57B6 wurden gemäß der Beschreibung (2.13.1) aktiv immunisiert. Der Krankheitsbeginn lag im Mittel bei zwölf Tagen nach der Immunisation und an Tag 27 erfolgte die Isolation. Im Mittel lag die höchste erzielte Punktzahl im klinischen Erkrankungstest bei 2,4, die im Durchschnitt an Tag 15 erreicht wurde. Zum Zeitpunkt der Isolation lag der Score bei allen Tieren der EAE-Gruppe über 0, und zwar im Mittel bei 1; das heißt es war keine komplette Krankheitsremission erfolgt. Die Tiere der Kontrollgruppe waren gesund. Der qRT-PCR aus der Abbildung 22 Teil A ist zu entnehmen, dass alle bis dahin bekannten Sirtuine der Klasse III und die assoziierten Gene des NAD+ Metabolismus Parp1 und vor allem Nampt in unserer EAE Gruppe induziert worden sind. Mit p-Werten unter 0,001 waren diese Ergebnisse vor allem für Sirt1 (Induktion auf das fast 30fache) und Sirt6 (Induktion um mehr als das 100fache) signifikant. Ebenfalls signifikant war das Ergebnis für Nampt, das um das fast 30fache ($p<0.001$) und Sirt7, das um das Zehnfache induziert wurde ($p<0,05$). In Abbildung 22 Teil B wurde die vorherig gezeigte Induktion von Sirt1 auf Proteinebene mit Hilfe eines Western Blots (WB) bestätigt. Allerdings waren die Banden der EAE Tiere M4 – M7 nicht im gleichen Maß verstärkt gegenüber der Kontrollgruppe M1 – M3 ausgeprägt, wie dies die qRT-PCR Ergebnisse aus Teil A hätten vermuten lassen.

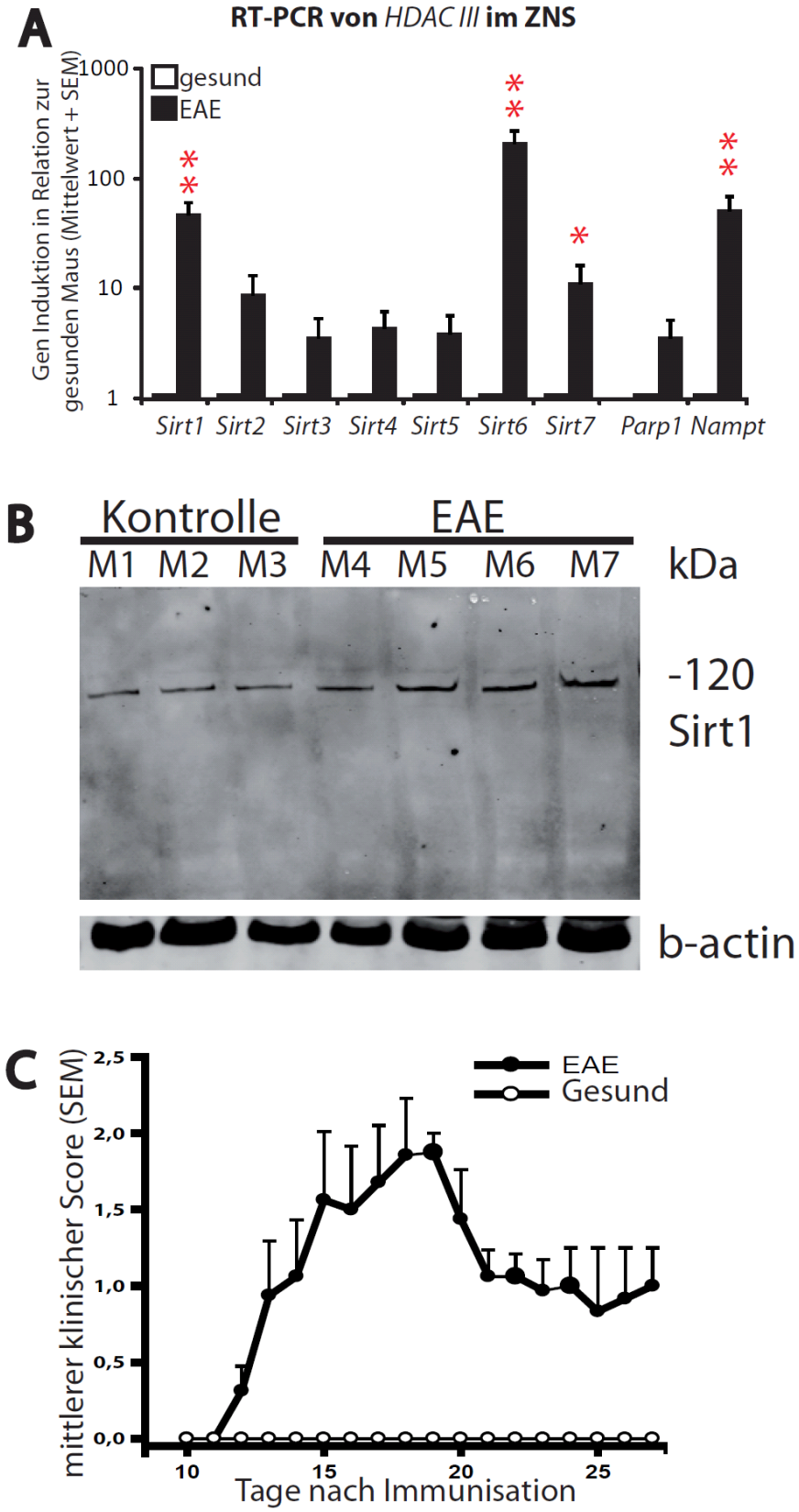


Abbildung 22: Aktive experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) A: *Induktion verschiedener Gene im Zerebellum (x-Achse) während EAE (qRT-PCR Messung), Mittelwert ± SEM in Relation zur gesunden Maus (y-Achse)* **B:** *Induktion von Sirt1 bei EAE-Tieren auf Proteinlevel (Western Blot),* **C:** *Vergleichsgruppen der EAE Induktion, „EAE“: alle erkrankten Tiere, mittlerer klinischer Score der aktiven EAE im Verlauf der Tage (Mittelwert ± SEM).*

Im Hippocampus dagegen, in dem die SGZ mit ihren Stammzellen lokalisiert ist, fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen erkrankten Tieren und Tieren der Kontrollgruppe. Allerdings handelte es sich dabei um eine passive EAE in 5 Wochen alten SJL Mäusen (2.13.2). Die Mäuse der erkrankten Gruppen zeigten bei RNA Isolation (Tag 39) im Durchschnitt einen Wert von 2,75 im klinischen Krankheitstest. Der höchste erreichte Wert lag im Mittel bei 3,7, jeweils um den fünfzehnten Tag erreicht. Daher handelte es sich hier ebenso um eine postakute Phase. Ebenso war der Unterschied im Hirnstamm nicht signifikant, wobei es sich hier um dieselbe aktive EAE handelte, in der auch die signifikanten Unterschiede der Sirt1 Expression im Kleinhirn gemessen werden konnten (Anhang D).

3.3.2 Einfluss entzündlicher Mechanismen auf die Sirt1 Induktion

Um den Einfluss der Entzündungsreaktion auf die Sirt1 Induktion in der EAE genauer zu analysieren, erfolgte *in vitro* eine Stimulation mit IFNγ in TSA3 und neuronalen Vorläuferzellen und eine Analyse der Sirt1 Expression in Entzündungs-assoziierten Zellen in der IHC. Durch die Immunisation kommt es in der EAE zu einer Entzündungsreaktion im ZNS der Mäuse. IFNγ ist ein sehr wichtiges Zytokin, das die Immunabwehr stimuliert und moduliert. Es wird von natürlichen Killerzellen, T_h1-Helfer Zellen und zytotoxischen T Lymphozyten produziert und spielt eine wichtige Rolle in der Genese autoimmuner Krankheiten.

Um die Stimulation mit IFNγ zu simlieren, wurden in diesem Experiment TSA3 Zellen (Astrozytenzelllinie) gemäß 2.9.2 kultiviert. In Anhang E ist sichtbar, dass die relative Expression von Sirt1 auf RNA Ebene von 0,68 $x10^{-3}$ auf 1,3 $x10^{-3}$ im Verhältnis zum *Housekeeping* Gen GAPDH anstieg, nachdem die TSA3 Zellen mit 100 U/ml Interferon γ für 24 Stunden behandelt wurden. Ähnlich stiegen auch die verwandten Sirtuine2 und 3 an. PARP1 hingegen zeigte bei oben genannten Bedingungen eine verminderte Expression von 0,3 auf unter 0,2 in Relation zum *Housekeeping* Gen GAPDH.

Interessant ist, dass dieser Effekt nicht in NVZ ausgelöst werden konnte. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Sirt1 Expression auf RNA Ebene (Abbildung 23). Lediglich Sirt2, 3, 6 und 7 zeigten in den E17 Vorläuferzellen eine leichte Inhibition der Expression nach Stimulation mit 100U/ml Interferon γ. In den adulten Vorläuferzellen aus der SVZ von drei Monate alten Weibchen war dies hingegen nicht mehr der Fall.

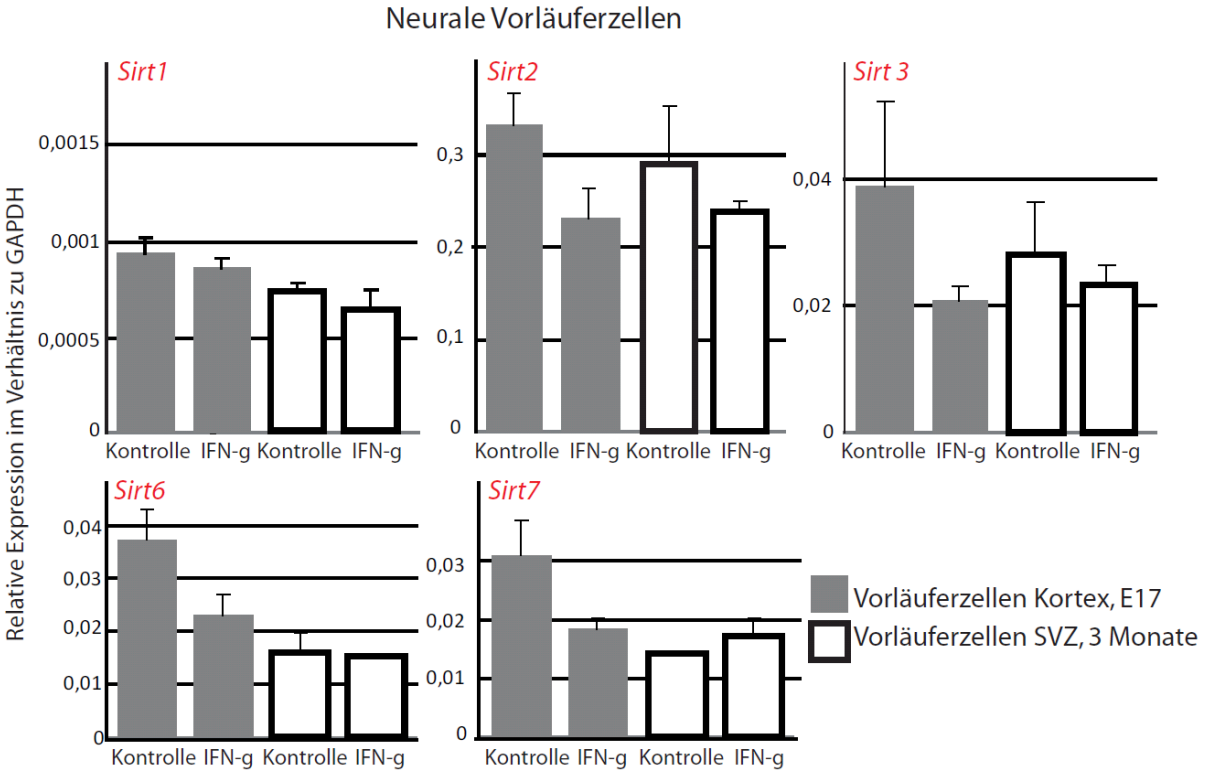


Abbildung 23: qRT-PCR Analysen aus neuralen Vorläuferzellen *E17 und drei Monate. Die Zellen wurden jeweils für fünf bis sechs Tage auf Poly-L-Ornithin kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit 100 U/ml Interferon γ stimuliert. In NVZ lassen sich insbesondere bei Sirt1 keine signifikanten Veränderungen nachweisen. Dies waren einzelne bestätigte Experimente, deshalb kann nicht statistisch getestet werden.*

Ebenfalls stellte sich die Frage, ob Sirt1 als Reaktion auf die entzündlichen Vorgänge in der ortsständigen Mikroglia oder einwandernden Makrophagen induziert wird. Daher erfolgte eine Analyse der Iba1+ positiven ortsständigen Mikroglia in der Nähe von Entzündungsherden, in denen sich eine Invasion von einwandernden Makrophagen zeigte. Wie in Abbildung 24 Teil B zu sehen, konnten fast überhaupt keine Sirt1+/Iba1+ doppelt positiven Zellen gefunden werden. Vereinzelt fanden sich hingegen Ly6c+/Sirt1+ doppelt positive Zellen, die am ehesten einwandernden Monozyten entsprechen (161). Eine interessante Beobachtung ist, dass in der Nähe dieser „aktiven" Läsionen eine vermehrte zytosolische Immunreaktivität unseres Sirt1 Antikörpers im Gegensatz zum normalen Reaktionsmuster detektiert werden konnte. In Teil A ist eine eher chronisch demyelinisierte Region (weniger CNPase) mit einer weißen Umrandung markiert. Die vermehrten Sirt1+ positiven Zellen fanden sich nicht darin, sondern in der umgebenden weißen Substanz (NAWM = *normal appearing white matter*). Wie auch in den gesunden Kontrolltieren (3.1.2) fanden sich auch in den EAE Tieren nur vereinzelte GFAP+/Olig2+/Sirt1+ dreifach positive Zellen in der NAWM (Teil A rechts).

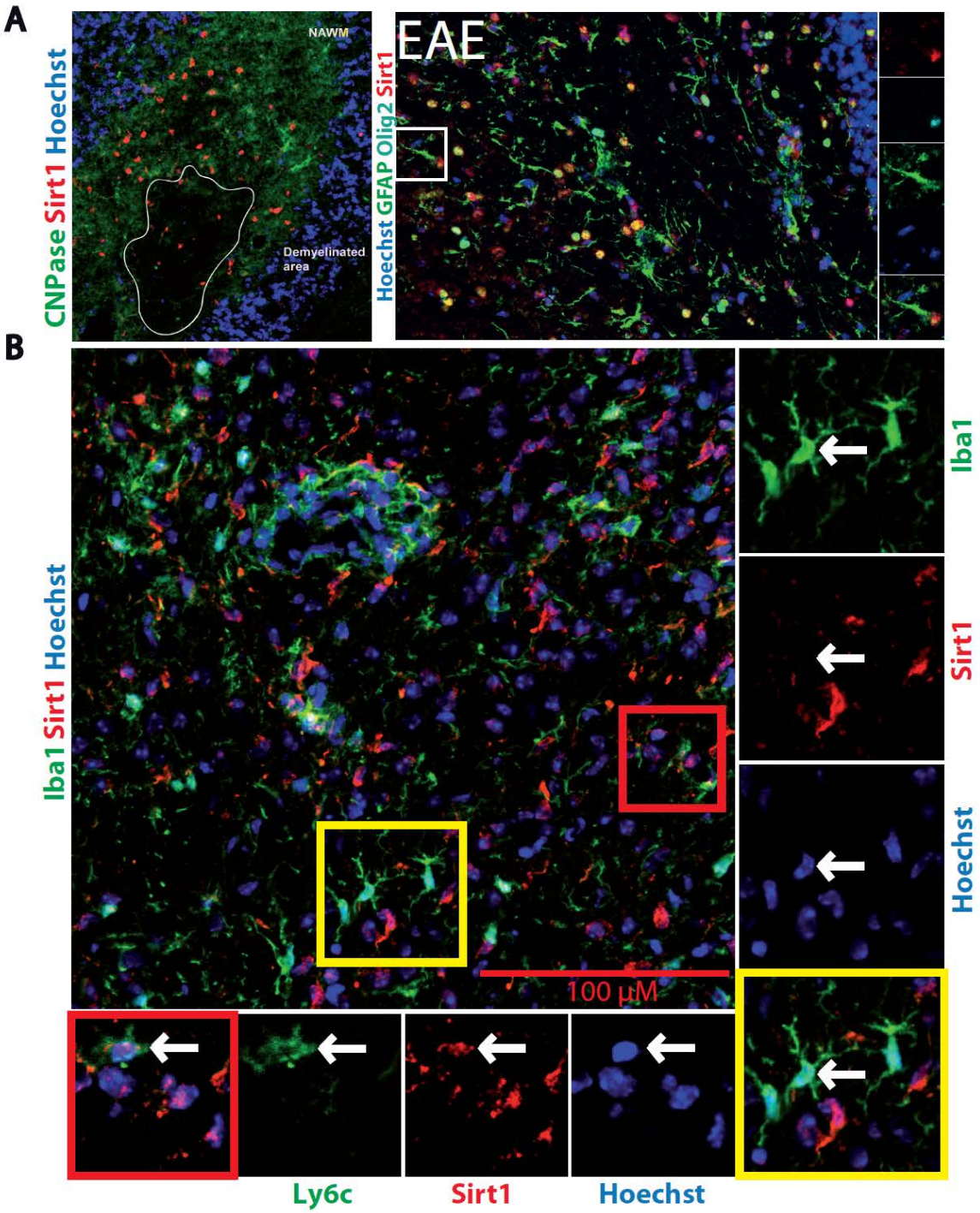


Abbildung 24: Sirt1 Expression in entzündlichen Läsionen A: *Verteilung des Sirt1 Proteins um eine demyelinisierende Läsion NAWM: Normal appearing white matter, rechts: vereinzelt fanden sich Sirt1+/Olig2+/GFAP+ dreifach positive Zellen* **B:** *Ortsständige Mikroglia und einwandernde Makrophagen. Es fanden sich keine Sirt1+/Iba1+ doppelt positiven Zellen, aber vereinzelte Sirt1+/Ly6c+ doppelt positive Zellen.*

3.3.3 Welche Zellen exprimieren Sirt1 in der EAE? – Analyse in der IHC

Nachdem in 3.1.2 gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der Sirt1+ positiven Zellen den Oligodendrozyten angehörte, sollte auch in der EAE die Verteilung von Sirt1 in diesen Zellen analysiert beziehungsweise mit den Kontrolltieren verglichen werden. Dazu wurde das Kleinhirn der im Schnitt drei Monate alten weiblichen C57B6 Mäuse untersucht, da dort im Mark viele OVZ und Oligodendrozyten liegen und die Induktion von Sirt1 in der EAE dort ihr signifikantes Maximum hatte.
In Abbildung 25 A ist zu erkennen, dass es in den EAE Tieren deutlich mehr Sirt1+/PDGFRα+ doppelt positive Zellen pro Quadratmillimeter Kleinhirnmark gab als in den Kontrolltieren. Die Sirt1+/ PDGFRα+ doppelt positiven Zellen waren in den erkrankten Tieren um das Doppelte erhöht (Teil B). Ebenso verhielt es sich mit den Sirt1+ beziehungsweise PDGFRα+ einfach positiven Zellen, die signifikant von 1000/mm^2 auf 1400/mm^2 beziehungsweise von 150/mm^2 auf 350/mm^2 anstiegen. Dass nicht nur die reine Anzahl der Zellen pro Fläche angestiegen ist, sondern auch eine größere Anzahl aller PDGFRα+ positiven Zellen gleichzeitig positiv für Sirt1+ war, zeigt Teil C. Hier sieht man, dass in der Kontrollgruppe 60 Prozent aller PDGFRα+ positiven Zellen auch positiv für Sirt1+ waren, während es in der EAE Gruppe 70 Prozent Sirt1+/ PDGFRα+ doppelt positive Zellen gab.

Ein noch größerer Unterschied zeigte sich in den NG2+ positiven Zellen (Abbildung 25 E). Hier waren 12 % aller NG2+ positiven Zellen bereits in den gesunden Kontrolltieren auch positiv für Sirt1+. In der EAE Gruppe dagegen waren 27 % aller NG2+ positiven Zellen NG2+/Sirt1+ doppelt positiv. Dies bedeutet einen signifikanten Anstieg um mehr als das Doppelte. Gleichzeitig stieg auch die reine Anzahl der NG2+/Sirt1+ doppelt positiven Zellen pro Fläche von 19 (Kontrollgruppe) auf 40 Zellen (EAE) pro Quadratmillimeter Kleinhirnmark. Repräsentative immunhistologische Ausschnitte zeigen eine NG2+/Sirt1- Zelle aus der Kontrollgruppe (Abbildung 25 D, links) und eine NG2+/Sirt1+ doppelt positive Zelle aus der EAE Gruppe (Teil D, rechts). In den Olig2+ positiven Zellen hingegen fand sich kein Anstieg der gleichzeitigen Expression von Sirt1. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der EAE Gruppe waren je 67 % aller Olig2+ positiven Zellen Olig2+/Sirt1+ doppelt positiv (Teil F). Repräsentative immunhistologische Ausschnitte der Kontroll- und EAE Gruppe, die Olig2+/Sirt1+ doppelt positive Zellen zeigen finden sich in Abbildung 25 G.

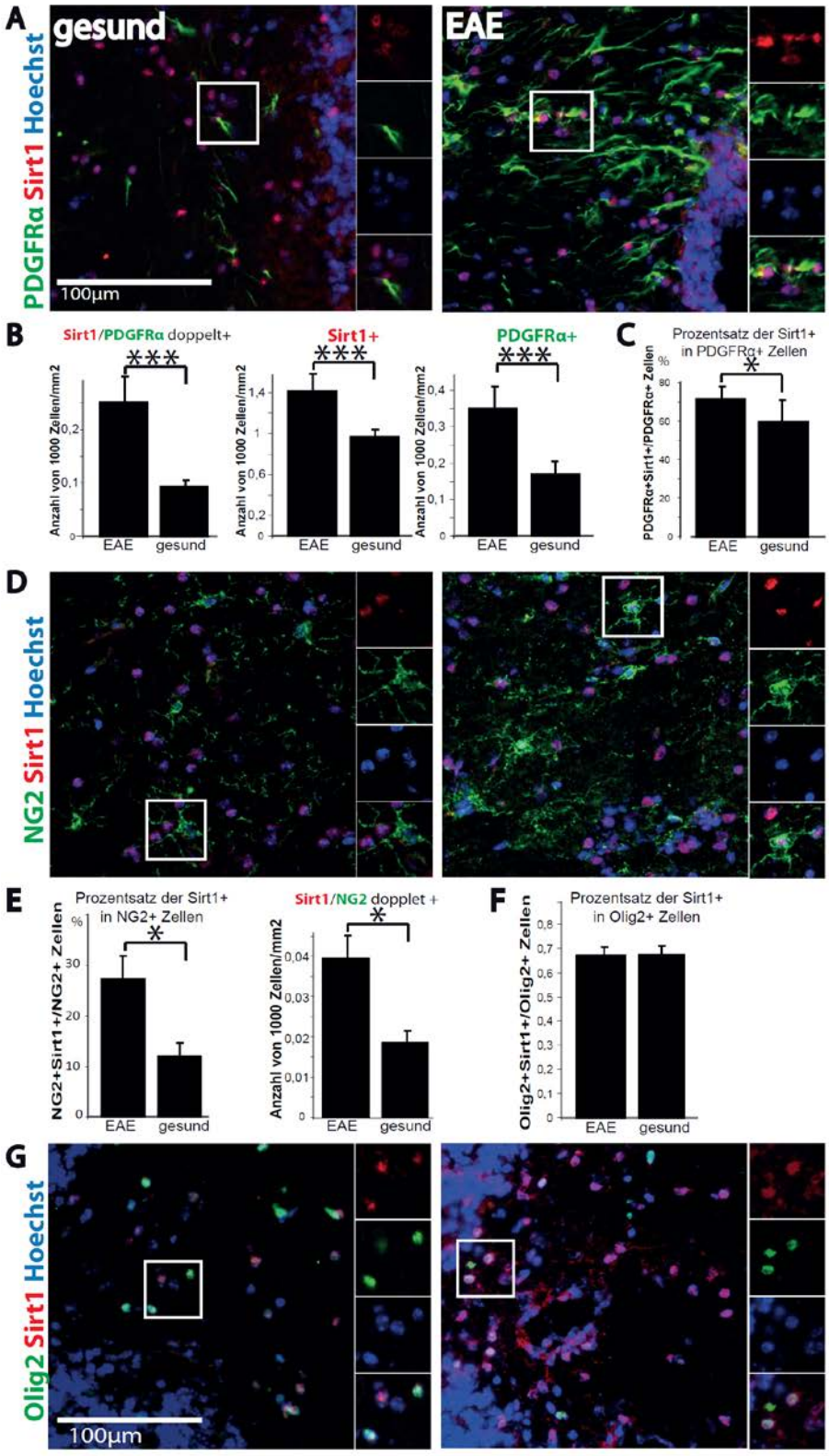


Abbildung 25: Sirt1 in Oligodendrozytenvorläufern in der weißen Substanz des Kleinhirns –IHC **A**: *Sirt1+/PDGFRα+ doppelt positive Zellen finden sich vermehrt in entzündlichen Regionen der EAE* **B: Quantifizierung**: *signifikant mehr Sirt1+, PDGFRα+ und Sirt1+/PDGFRα+ positive Zellen in der EAE* **C**: *Von allen PDGFRα+ positiven Zellen sind in der EAE signifikant mehr Sirt1+/PDGFRα+ doppelt positiv* **D: Sirt1+/NG2+ doppelt positive** *Zellen finden sich vermehrt in entzündlichen Regionen der EAE* **E: Quantifizierung**: *signifikant mehr Sirt1/NG2+ doppelt positive Zellen in der EAE und ein deutlich gestiegener Anteil Sirt1+ positiver an allen NG2+ Zellen* **F:** *kein erhöhter Anteil Sirt1+ positiver Zellen in allen Olig2+ positiven Zellen* **G: IHC** *Abbildung der Sirt1+/Olig2+ doppelt positiven Zellen. Es sind jeweils repräsentative Bilder aus mindestens drei verschiedenen Schnitten und drei verschiedenen Mäusen gezeigt. (Mittelwert ± SEM) t-test: *p-Werte < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005.*

3.3.4 Analyse der Sirt1 Aktivität in der EAE

In diesem Teil der Arbeit ging es darum, die tatsächliche Aktivität von Sirt1 zu detektieren. Sirt1 wirkt als Histondeazetylase vor allem an den Histonen H3K9 und H4K16, an denen es Azetylreste entfernt. In Abbildung 26 sind repräsentative Ausschnitte des Kleinhirnmarkes von an EAE erkrankten Tieren dargestellt. Die Grafik rechts zeigt, dass in über 60 % aller Sirt1+ positiven Zellen wenig bis gar kein azetyliertes H3K9 vorliegt. Ebenso haben auch fast 70 % aller Sirt1+ positiven Zellen wenig azetyliertes H4K16.

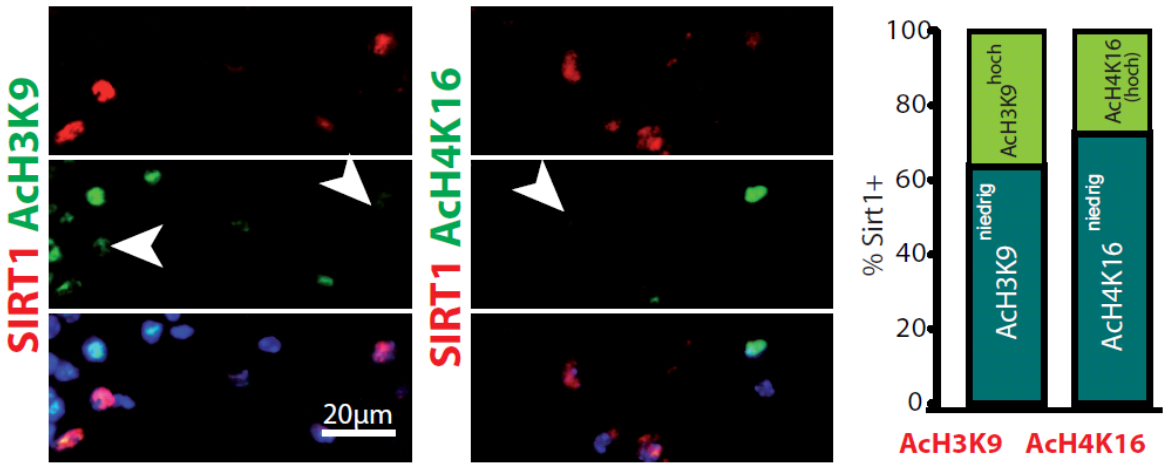


Abbildung 26: Analyse der Azetylierung bzw. Methylierung der Histone H3K9 und H4K16 *in Sirt1+ positiven Zellen in demyelinisierten Arealen der weißen Substanz im Kleinhirn. Die Pfeile zeigen einen niedrigen Level an Histon-Azetylierung (nicht positiv für acH3K9, acH4K16) im Zellkern Sirt1+ positiver Zellen. Die immunhistologischen Färbungen zeigen einen repräsentativen Ausschnitt. Quantifizierung der Sirt1+ positiven Zellen, wobei die Mehrzahl ein niedriges Level an azetylierten Histonen zeigte.*

4 Diskussion

4.1 Lokale Expressionsmuster von Sirt1 im ZNS der Maus und Veränderung im Alter

4.1.1 Das Sirt1 Protein zeigte Koexpression mit Stammzellmarkern und Markern der OVZ in adulten Keimzentren des Mausgehirnes

In bisherigen immunhistologischen Analysen unserer Arbeitsgruppe im postnatalen (P2) ZNS sind Sirt1+ positive Zellen in der SVZ des Seitenventrikels und entlang des rostralen Migrationsstromes (RMS) gefunden worden (5). In dieser Analyse sollten die Sirt1+ positiven Zellen in den Keimzentren des Gehirns im Hinblick auf ihre weitere Markerexpression untersucht werden.

In immunhistologischen Färbungen der SVZ (3.1.1) fanden sich Sirt1+/Nestin+ doppelt positive Zellen unterhalb der einreihigen Ependymzellschicht. Diese sind demnach als Stammzellen der SVZ (Typ B-Zellen) zu werten (162), da bereits die transienten Typ C-Zellen kein Nestin mehr exprimieren. Nestin ist ein Neurofilament, das während der Entwicklung von vielen sich teilenden Zellen im ZNS, PNS und anderen Geweben exprimiert wird, aber in adulten Organismen fast ausschließlich in neuralen Stammzellen vorkommt (163).
Diese Typ B-Stammzellen exprimieren ebenfalls GFAP (149), wobei hier zwischen B1 Zellen nahe den Ependymzellen und B2-Zellen, die durchwandernde Typ A-Zellen ummanteln, unterschieden werden muss. Die Sirt1+/GFAP+ doppelt positiven Zellen konnten im direkten Kontakt zu den Ependymzellen in der Nähe von Gefäßen gefunden werden und entsprechen somit am ehesten B1-Zellen. Auch dies entspricht der Vermutung, dass neurale Stammzellen Sirt1 exprimieren und ist konkordant mit anderen Arbeiten (63;164). Des Weiteren ist aber festzuhalten, dass auch Zellen Sirt1 exprimierten, die weder Nestin+ noch GFAP+ positiv waren. Die meisten dieser Sirt1+ positiven Zellen lagen aber außerhalb der zweizellkörperbreiten SVZ, waren Sirt1+/PDGFRα+ doppelt positiv und demnach als Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (OVZ) zu werten.

In immunhistologischen Färbungen der SGZ (3.1.1) konnten Sirt1+/Sox2+, Sirt1+/Nestin+, Sirt1+/GFAP+ und Sirt1+/PDGFRα+ doppelt positive Zellen gefunden werden. Die Sirt1+/Sox2+ doppelt positiven Zellen waren klein, kugelförmig und fanden sich sowohl in der Nähe der SGZ als auch inmitten des Hilus in der Nähe von Gefäßen. Da Sox2 sich in vielen der sich teilenden Vorläuferzellen und allen Stammzellen der adulten Keimzellregionen findet

(165) und in der adulten Neurogenese am engsten von allen Transkriptionsfaktoren mit Stammzellen assoziiert wird (166), bedeutet dies, dass Sirt1 in adulten Stammzellen exprimiert wird.

Bisher wurde in Nestin+ positiven Zellen der SGZ wenig Sirt1 gefunden (63). Auch in dieser Arbeit konnten nur wenige Sirt1+/Nestin+ doppelt positive Zellen gefunden werden, die mit vielen Eigenschaften eines Astrozyten (167) und einem typischen dreiecksförmigen Zellkörper, der etwas größer als die umgebenden Granulazellen ist (168), am ehesten Typ 1-Stammzellen entsprachen. Ungefähr zwei Drittel aller Nestin+ positiven Zellen sind auch tatsächlich Typ 1-Stammzellen, wobei nur fünf Prozent aller Zellteilungen von Nestin+ positiven Zellen auch in Typ 1-Zellen mit der Morphologie radialer Gliazellen stattfindet (169). So wurde die Theorie aufgestellt, dass außer den radialen Gliazellen („vertikale Astrozyten“) noch weitere GFAP+ positive Stammzellen in der SGZ existieren (166). Diese könnten die Sirt1+/GFAP+ doppelt positiven Zellen sein, deren Zellfortsätze nicht bis in die granulare Schicht reichten und die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in der SGZ gefunden wurden. Es könnte sich bei diesen Zellen allerdings auch um neu generierte Astrozyten („horizontale Astrozyten“) handeln (170). Außerdem ließen sich diese Sirt1+/GFAP+ doppelt positiven Zellen auch inmitten des Hilus finden.
Auch in der SGZ waren sehr viele Sirt1+/ PDGFRα + doppelt positive Zellen zu finden, die entweder in mitten des Hilus oder angrenzend an die/in der SGZ lagen. Diese Zellen entsprechen auch hier am ehesten OVZ.

Generell muss man sagen, dass nur wenige der reifen granulären Neurone mit unserem chSirt1 Antikörper gefärbt wurden, im Gegensatz zu anderen Publikationen, die dort eine deutliche Expression von Sirt1 zeigten (171) und zusätzlich die Färbung der Moosfasern im Hilusbereich als unspezifisch deuteten. Allerdings färbten sich mit unserem Antikörper nicht die Moosfasern selber, sondern eindeutig nukleäre Strukturen. In NVZ-Kulturen zeigte sich in unseren Arbeiten ebenfalls eine nukleäre Expression von Sirt1.

Die Erkenntnis, dass Sirt1 sich in neuralen Vorläuferzellen und adulten Stammzellen in den Keimzellregionen der Maus findet, konnte unlängst in einer aktuellen Publikation bestätigt werden (6). Dort wurde auch gezeigt, dass Sirt1 sich in Zellen der Oligodendrozytenlinie findet (Sirt1+/Olig2+), allerdings wurde nicht explizit auf die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten geschaut. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sirt1 auch in den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (Sirt1+/PDGFRα+) in den Keimzellregionen der adulten Maus zu finden ist.

4.1.2 Sirt1 fand sich vor allem in reifen Oligodendrozyten und OVZ im Kleinhirnmark

Nachdem sich aus der vorherigen Analyse der Keimzellregionen des adulten Gehirnes Hinweise auf eine Sirt1 Expression in der Oligodendrozytenlinie ergaben, wurde in Teil 3.1.2 das Kleinhirnmark untersucht, da sich hier fünf bis acht Prozent OVZ und viele reife Oligodendrozyten finden (94). Die typischen „Perlenketten" der reifen Oligodendrozyten im Kleinhirnmark waren deutlich positiv für Sirt1 und exprimierten gleichermaßen sowohl den *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor Olig2, der in reifen Oligodendrozyten und in OVZ zu finden ist (1.5.4), als auch den HMG (*high-mobility-group*)-Transkriptionsregulator Sox10, der im Gehirn ausschließlich in Zellen der Oligodendrozytenlinie zu finden ist (108). Da fast 90 Prozent der Sirt1+/Olig2+ doppelt positiven Zellen auch Sox10-GFP exprimierten, sind diese mit hoher Sicherheit der Oligodendrozytenlinie zuzuordnen. Dass Sirt1 sich hingegen nur in knapp 70 Prozent aller Olig2+ positiven Zellen fand, lässt sich dadurch erklären, dass sich Olig2 auch in unreifen Astrozyten findet und dort eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielt (172).

Ebenso fanden sich Hinweise, dass Olig2+ positive Zellen der Astrozytenlinie Ursprung der reaktiven Gliose nach Schädigung des Gehirnes sind (173). Auch im Kleinhirnmark fanden sich vereinzelt Olig2+/GFAP+/Sirt1+ dreifach positive Zellen, die der Ursprung der reaktiven Astrozyten sein könnten. Insgesamt waren zehn Prozent aller Sirt1+ positiven Zellen auch GFAP+ positiv. Die Gesamtheit aller Sirt1+ positiven Zellen im Mark des Kleinhirns setzte sich hauptsächlich aus Gliazellen zusammen, wobei zehn Prozent der Sirt1+ positiven Zellen PDGFRα+ positiv und somit eindeutig als OVZ zu identifizieren waren.

4.1.3 Sirt1 war im Alter in der qRT-PCR signifikant erhöht

Um herauszufinden, ob sich die Expression der Sirtuine beziehungsweise der verwandten Gene im Alter natürlicherweise verändert, wurde in diesem Teil der Arbeit eine Analyse der RNA Expressionen während des Differenzierungsprozesses in alternden NVZ zu zwei verschiedenen Zeitpunkten und in bestimmten Hirnregionen gesunder weiblicher C57B6 Mäuse verschiedenen Alters durchgeführt. Sowohl die gealterten NVZ *in vitro* als auch das Kleinhirn und die Kortices der ein Jahr alten Mäuse zeigten eine signifikante Erhöhung der Sirt1 Expression auf RNA Ebene.

Eine ähnliche Induktion von Sirt1 in nicht beziehungsweise normal alternden Mäusen fand sich in *senescene-accelerated mice resistent* Mäusen (SAMR1; Kontrollstamm des *senescence-accelerated mice prone* (SAMP8) Mausstammes), die mit sechs, neun und zwölf Monaten eine signifikant höhere Sirt1 Expression im WB zeigten als mit drei Monaten (174). Für diese Beobachtung spricht, dass auch in anderen Organen bei normaler Alterung eine

endogen erhöhte Expression von Sirt1 im Alter gefunden werden konnte. So zeigte sich in den Herzen von gealterten Affen ebenfalls eine signifikante fast dreimal höhere Expression von Sirt1 als in jüngeren Affen (175). In dieser Publikation konnte auch gezeigt werden, dass eine milde Überexpression von Sirt1 die altersabhängigen kardialen Veränderungen (Hypertrophie, intestinale Fibrose und Apoptose) bei Affen verzögert. Diese wiederholte Beobachtung der Hochregulation von Sirt1 bei „normalem" Altern könnte als Gegenregulation des Organismus auf vermehrte DNA Schäden durch im Alter kumulierte Strangbrüche und vermehrten oxidativen Stress zu deuten sein. Denn eine erhöhte Sirt1 Expression bietet eine verbesserte genomische Stabilität (43;44;52;176;177).
Andererseits ist ebenfalls bekannt, dass Sirt1 zwar die Lebensspanne verschiedener Organismen verlängern kann (49;51), gleichzeitig aber auch in einer großen Anzahl an Tumoren vermehrt exprimiert wird (48) und die Tumorgenese unterstützt, da trotz eines vorhandenen DNA Schadens keine Apoptose einsetzt.

Zur Diskussion bleibt, dass in einigen Publikationen eine verminderte Expression des Sir1 im Alter gefunden wurde. So zeigte sich in Teilen des Hypothalamus (Nucleus arcuatus) eine deutliche Reduktion der Sirt1 mRNA in der *in-situ* Hybridisierung in zwölf und 24 Monate alten Mäusen im Gegensatz zu vier Monate alten Kontrollen (178). Allerdings gab es auch schon in dieser Publikation Regionen des Hypothalamus (VMH), in denen sich eine Induktion des Sirt1 im Alter zeigte. Vor allem zum Kleinhirn, das bei uns die höchste signifikant gesteigerte Expression im Alter zeigte, finden sich in dieser Publikation keine Daten. Dies deutet auf eine spezifische Regulation der einzelnen Hirnareale im Alter hin. In Geweben mit hoher mitotischer Aktivität (Hoden) konnte ebenfalls eine Reduktion der Menge des Sirt1 Proteins (Western Blot) in zwei Jahre alten B6 Mäusen beobachtet werden (179). Dort wurde als mitotisch weniger aktives Gewebe auch das Gehirn auf seine Sirt1 mRNA- und Proteinexpression hin untersucht. Hier zeigte sich im WB und auch in der qRT-PCR keine signifikante Änderung des Sirt1 mit anti-C-terminalem Antikörper. Allerdings kam es erstens mit dem N-terminalen Sirt1 Antikörper auf Proteinebene ebenfalls zu einem Anstieg der Expression im Alter und zweitens schaute diese Studie nicht auf spezifische Änderungen einzelner Hirnregionen im Alter (179).

4.2 Analyse von Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Tieren und Zellen – Sirt1 Inhibition hat Einfluss auf die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Oligodendrozyten

4.2.1 Sirt1 mRNA korreliert in der SVZ mit Sox9 und Sox10 mRNA

Nachdem zuvor eine Expression von Sirt1 in Zellen der Oligodendrozytenzelllinie gezeigt werden konnte, sollte in diesem Teil der Arbeit analysiert werden ob der Verlust eines

funktionalen Allels (Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Mäuse) Auswirkungen auf die Expression von Oligodendrozyten-spezifischen Genen hat. In der subventrikulären Zone zeigte sich unter allen getesteten Genen der Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Mäuse in der qRT-PCR lediglich eine signifikante Inhibition von Sox10, dessen absolute Ausprägung auf RNA Ebene stark mit der des Sirt1 korrelierte. Im Gegensatz dazu ergab sich im Kleinhirn bei ein Jahr alten Tieren eine signifikante Induktion von Sox9. Das heißt es findet sich eine Dysregulation von Genen, die mit der Oligodendrozytenzelllinie verbunden sind. Die Diskrepanz lässt sich unter Umständen durch regional verschiedene Aufgaben von Sirt1 in Stammzellen der SVZ im Gegensatz zu den Zellen des Kleinhirns erklären, wo Sirt1 in obiger Analyse hauptsächlich in Zellen der Oligodendrozytenlinie gefunden wurde. Generell scheinen Sirt1$^{\Delta ex4/wt}$ Mäuse den Verlust des funktionellen aktiven Zentrums von Sirt1 (2.11) auf nur einem Allel aber gut zu kompensieren, da keine klinischen oder anatomischen Auffälligkeiten beobachtet werden konnten und auch sonst keine deutlichen Veränderungen in der RNA-Expression detektiert werden konnten (ohne Abbildung).

4.2.2 Sirt1 scheint Einfluss auf die embryonale Differenzierung von OVZ zu nehmen

Um die Auswirkungen eines kompletten Ausfalls der HDAC Funktion des Sirt1 Proteins zu testen, wurden embryonale Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse auf ihre Muster der verschiedenen Vorläuferzellen hin untersucht und mit Sirt1$^{wt/wt}$ Mäusen verglichen. Bis auf gelegentliche Exenzephalien und eine geringere Größe entwickelten die Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse einen normalen Phänotyp und insbesondere auch ein vollständig angelegtes Gehirn.
Aus veröffentlichten Studien ist bekannt, dass die höchste embryonale Sirt1 mRNA Expression im Stadium E4.5 vorhanden ist, von da an langsam sinkt, aber im späten embryonalen Stadium E18.5 immer noch in sehr großer Menge vorhanden ist (180). Die bevorzugten Gewebe der Expression sind Herz, Gehirn, Rückenmark und die Spinalganglien (180). Aus diesem Grund wurden für diese Studien Embryonen im Stadium E16 gewählt, da die Sirt1 Expression fast anhaltend hoch ist, aber bedingt durch die weiter fortgeschrittene Entwicklung eine bessere Differenzierung der einzelnen Hirnregionen möglich war.

In vorliegender Arbeit konnte Sirt1 vor allem auch in Sox2+ Zellen der SVZ der Seitenventrikel gefunden werden (3.1.1). Der Transkriptionsfaktor Sox2 (*Sry-related HMG Box 2*) spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems (181) und wird in embryonalen neuralen Stammzellen exprimiert (182). Um zu überprüfen, ob Sirt1 einen Einfluss auf die Expression von Sox2 hat, wurden Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse mit Wildtyptieren im Hinblick auf ihre Sox2 Expression verglichen. Da sich hierbei überhaupt kein Unterschied der Expression feststellen ließ (3.2.2), scheint Sirt1 zumindest mit seinem katalytischen

Zentrum keinen Einfluss auf die Sox2 Expression beziehungsweise die Genese embryonaler neuraler Stammzellen zu haben.
Ebenso lag keine offensichtliche Störung der Entwicklung der Olig2+ positiven Zellen in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen vor, wenn auch vor allem in der SVZ des Seitenventrikels eine leicht verstärkte Expression von Olig2 in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen beobachtet werden konnte.
Im Gegensatz dazu scheint Sirt1 aber einen Einfluss auf die Differenzierung der OVZ zu Oligodendrozyten zu haben, da sich in der zerebellären Anlage zumindest zweier der E16 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen eine verfrühte MBP Markerexpression in der Immunhistochemie detektieren ließ. Diese Tiere wiesen keine Exencephalien oder sonstige Auffälligkeiten auf. Ähnlich konnte eine verstärkte Reaktivität für CNPase in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen beobachtet werden. Passenderweise zeigte sich in der ergänzenden qRT-PCR von E14.5 Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen (ohne Abbildung) eine Inhibition von ID2 und ID4, die beide als Transkriptionsinhibitoren der Oligodendrozytendifferenzierung gelten (106). Zusätzlich ist Mash1, das bekanntermaßen die Differenzierung von Oligodendrozyten induziert (116), deutlich erhöht exprimiert. Eine verstärkte Detektion der RNA der Myelingene konnte allerdings nicht verzeichnet werden und in E17.5 Embryonen ließen sich in der qRT-PCR keine signifikanten Veränderungen mehr feststellen (ohne Abbildung).

4.2.3 Inhibition der Sirt1 HDAC Funktion hat Einfluss auf die Differenzierung von Oligodendrozyten

Um den beobachteten Einfluss der Sirt1 HDAC Funktion auf die Oligodendrozyten-differenzierung genauer zu analysieren, wurden embryonale NVZ aus Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ und Wildtypmäusen isoliert. Im Screening mittels qRT-PCR zeigte sich die Inhibition von Zellzyklusinhibitoren (zum Beispiel p21 und PTEN). Für den Einfluss von Sirt1 auf die Oligodendrozytenentwicklung ist vor allem die starke Inhibition der Transkriptionsinhibitoren ID2 und Hes5 in den Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ interessant, da diese normalerweise die Differenzierung zu reifen, Myelin produzierenden Oligodendrozyten unterdrücken (106). Im Gegensatz dazu zeigte der Transkriptionsfaktor Mash1, der bekanntermaßen die Oligodendrozytendifferenzierung aktiviert (116), eine reproduzierbare eindeutige Induktion.
Unter Oligodendrozyten-induzierenden Bedingungen konnte in Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ in der IHC eine verfrühte Expression des Glykolipids O4 detektiert werden, das als einer der ersten Marker die differenzierten Oligodendrozyten markiert. Exakt dieser Effekt der verfrühten beziehungsweise erhöhten O4 Expression konnte in einer ganz aktuellen Publikation aus 2013 bestätigt werden: Sowohl in Kultur adulter Stammzellen, die kein funktionelles Sirt1 besaßen (NestinCre;Sirt1$^{lox/lox}$), als auch bei selektiver Sirt1 Inhibition (EX-527) zeigten sich erhöhte Prozentzahlen O4 positiver Zellen (6).

In dieser Publikation konnte gleichzeitig auch gezeigt werden, dass bei Gehirn-spezifischer Inaktivierung von Sirt1 die Population der proliferierenden NVZ und auch OVZ erhöht war (6). Diese Rolle der Inhibition der Oligodendrozytenvorläuferzellen beziehungsweise Inhibition der Oligodendrozytendifferenzierung von Sirt1 wird durch unsere Beobachtung unterstützt, dass Sirt1Δex4/Δex4 Mäuse (E17) in einigen (aber nicht allen) Tieren eine deutlich verfrühte Expression der Myelinmarker (MBP, CNPase) zeigen. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse deutet auf einen Einfluss von Sirt1 sowohl auf die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen also auch die Differenzierung von Oligodendrozyten hin.

Es ist in der Literatur vielfach bestätigt, dass HDAC1 und HDAC2 für die Entwicklung von Oligodendrozyten notwendig sind, da zum Beispiel Mäuse, in denen beide Gene in den Oligodendrozyten ausgeschaltet waren, keine Entwicklung von den Oligodendrozyten-spezifischen Markern PDGFRα, Olig2, NG2, PLP oder MBP im Rückenmark zeigten (99). Bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu myelinisierenden Oligodendrozyten *in vitro* wurde ein Verlust von Azetylgruppen an Lysinresten der nukleosomalen Histone H3 und H4 beobachtet, was ebenfalls für eine Aktivierung von HDACs sprach (107). Ebenso führte eine Behandlung mit Trichostatin A (TSA – ein Inhibitor von HDAC der Klassen I und II) zu einem Arrest von OVZ in einem unreifen Stadium mit fehlender Expression von PLP und GalC (107). Die Entwicklung zu Astrozyten war jedoch trotz TSA möglich.
Im Corpus callosum von jungen Nagern in der Entwicklung (ab Geburt bis P 10) führte Valproinsäure (VPA – ein Inhibitor von HDAC der Klassen I und II) zu signifikanter Hypomyelinisierung mit verzögerter Expression von Differenzierungsmarkern wie MBP, MAG und dem Transkriptionsfaktor Sox10. Nach dem Start der Myelinisierung hatte VPA (ab der dritten Woche) keinen Einfluss auf die Expression von Myelin (183). Ähnlich inhibierte VPA eine Differenzierung von NVZ aus dem adulten Hippocampus in Richtung der Astrozyten und Oligodendrozyten und induzierte gleichzeitig die neurale Differenzierung (184). Auch in Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass HDAC1 für die Spezifizierung von Oligodendrozyten notwendig war (185). Im Gegensatz dazu war von Sirt2 (HDAC Klasse III) bekannt, dass eine Ausschaltung der Expression zu einer gesteigerten morphologischen Differenzierung von Oligodendrozyten führte (81).
Zum Zeitpunkt der Arbeit war jedoch noch nicht gezeigt worden, dass auch Sirt1 einen Einfluss auf die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläufer hat. In der vorliegenden Arbeit konnte die Induktion der Oligodendrozytendifferenzierung bei Verlust des funktionalen Sirt1 Proteins gezeigt werden.

Interessant ist auch, dass Sirtinol (Inhibitor für HDAC der Klasse III – Sirt1/Sirt2) eine Aktivierung der HDAC der Klassen I und II induzierte (183). Dies könnte bedeuten, dass der in dieser Arbeit beobachtete Effekt der verfrühten Expression der Myelinmarker in der Embryonal- und Oligodendrozytenentwicklung von Sirt1 HDAC defizienten Mäusen beziehungsweise Zellen auf eine vermehrte Aktivierung von HDACs der Klasse I / II zurückzuführen war, die normalerweise von Sirt1 supprimiert würden, um eine vorzeitige Oligodendrozytenentwicklung zu verhindern. Dies könnte in den Sirt1 defizienten Organismen einerseits durch eine höhere Anzahl an azetylierten Lysinresten der HDAC Klasse I / II selber (als posttranslationale Modifikationen) zu erklären sein, die nicht mehr durch Sirt1 entfernt würden und so zu einer gesteigerten Aktivität führten. Um diese Hypothese der Regulation von HDAC Klasse I und II durch Sirtuine zu bestätigen, müsste die Expression und Aktivität dieser Proteine in den Sirt1 defizienten Oligodendrozytenkulturen beziehungsweise Mäusen bestimmt werden.
Andererseits könnten Regulatorproteine zwischengeschaltet sein, die bei Sirt1 Defizienz nicht mehr deazetyliert würden. So scheint Sirt1 auch normalerweise PDGFRα zu deacetylieren, da bei Abwesenheit eines funktionalen Sirt1 Proteins PDGFRα vermehrt exprimiert wird und eine größere Menge an acetyliertem H3K9 aufweist (6). Da gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von PDGFRα zu einer vermehrten Produktion von OVZ und auch differenzierten Oligodendrozyten führt (137), könnte dies ein Weg sein über den Sirt1 die Entwicklung von OVZ und Oligodendrozyten reguliert.

4.3 Gesteigerte Expression des Sirt1 in OVZ in der EAE

4.3.1 Sirt1 Induktion im Kleinhirn während aktiver EAE

Ziel dieser Arbeit war es, die in vorherigen Arbeiten beobachtete vermehrte Ausprägung von Sirt1 in EAE Mäusen genauer zu charakterisieren. Bisher konnte Sirt1 vor allem in GFAP+ positiven Zellen (reaktive Astrogliose) gefunden werden, wobei die Sirt1+ positiven Zellen nur einen kleinen Teil aller GFAP+ positiven Zellen ausmachten (5). Der Fokus dieser Arbeit lag auf den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten, da sowohl die differenzierten Oligodendrozyten als auch die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten Sirt1 exprimieren und diese im Zusammenhang der EAE zu diesem Zeitpunkt noch nicht analysiert worden waren. Allerdings zeigten NVZ unter prooxidativen Bedingungen keine Änderung der Oligodendrozytenhäufigkeit (5).

In einer aktiven EAE in circa 13 Wochen alten weiblichen C57B6 Mäusen zeigte sich im Kleinhirn eine signifikante Induktion des Sirt1 auf das 30fache in der quantitativen RT-PCR. Diese Tendenz der Induktion konnte im WB bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte im Hippocampus und Hirnstamm kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies ist interessant, da schon im Alter eine signifikante Induktion des Sirt1 hauptsächlich im Kleinhirn festgestellt werden konnte.

Ebenso stieg während der EAE im Kleinhirn die mRNA der Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase (Nampt) signifikant auf das fast 30fache an. Dies ist ein Hinweis auf die tatsächlich gesteigerte Aktivität der Sirt1 Reaktion in der EAE, da die Nampt das Nebenprodukt der Reaktion - Nikotinamid (NAM) - in Nikotinamid-Mononukleotid umwandelt, welches dann zusammen mit ATP NAD+ (Kofaktor der Reaktion) regeneriert. So lässt eine aktivierte Nampt NAD+ ansteigen und kann darüber Sirt1 aktivieren (186;187). Dieser Zusammenhang von Sirt1 und Nampt konnte bestätigt werden, da eine Überexpression von Nampt nur bei funktionsfähigem Sirt1 zu einem gesteigerten Überleben unter oxidativem Stress führen kann (188). In der EAE könnte das induzierte Nampt also für eine weitere Induktion der Sirt1 Reaktion sorgen.

Die Poly-(ADP Ribose)- Polymerase (PARP) hingegen ist ein nukleäres Enzym, das NAD+ in NAM und ADP-Ribose spaltet und so NAM ansteigen lässt, wodurch wiederum die Aktivität der NAD+ abhängigen Sirtuine inhibiert wird (189;190;191). In unserer EAE konnte passenderweise kein signifikanter Anstieg für PARP1 gefunden werden. Dies ist entsprechend der Beobachtung, dass im Rückenmark von EAE Mäusen zwar PARP-3 vermehrt, aber PARP-1 vermindert exprimiert wurde (192).

Interessant ist auch die vermehrte Expression von Sirt2 im Rahmen der in dieser Arbeit induzierten EAE, da von Sirt2 bekannt ist, dass eine Überexpression die morphologische Differenzierung von OVZ zu Oligodendrozyten unterdrückt (81). So könnte auch das induzierte Sirt2 während der EAE eine weitere Ursache für mangelnde Remyelinisierung sein.

4.3.2 Theorien der Sirt1 Induktion in der EAE

Es konnte gezeigt werden, dass 100 U/ml Interferon γ für 24 Stunden die Sirt1 Expression in einer Astrozytenzelllinie (TSA3) in der qRT-PCR mehr als verfünffachte (Anhang E). Dies spricht für eine Reaktion der Astrozyten auf ein erhöhtes Interferon γ Level, so wie es in der EAE vorkommt. Allerdings ließ sich dieser Effekt nicht in NVZ auslösen, weder embryonaler noch adulter Herkunft.

Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit in immunhistologischen Färbungen aus EAE Tieren gezeigt werden, dass die ortsständige aktivierte Mikroglia (Iba1+ positiv (193)) kein Sirt1 exprimierte. Lediglich einige Sirt1+/Ly6c+ doppelt positive Zellen deuteten darauf hin,

dass einwandernde Monozyten Sirt1 exprimierten, die sich dann in Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren (161). Dies könnte einen Teil des vermehrten Sirt1 Proteins ausmachen.

4.3.3 Gesteigerte Sirt1 Expression in OVZ in der EAE

In weiteren immunhistologischen Färbungen und Quantifizierungen konnte gezeigt werden, dass die Sirt1+ Expression sowohl in PDGFRα+ als auch in NG2+ positiven OVZ während der EAE signifikant zunahm. Demnach gab es auch signifikant mehr PDGFRα+/Sirt1+ und NG2+/Sirt1+ doppelt positive Zellen in der EAE. Dies deutete auf einen Zusammenhang zwischen Sirt1 und Zellen der Oligodendrozytenlinie in der EAE hin. Besonders im Hinblick auf den zuvor festgestellten Einfluss von Sirt1 auf die Differenzierung von Oligodendrozyten ist dies im Zusammenhang mit meist unzureichender Remyelinisierung unter entzündlichen Bedingungen ein interessanter Ansatz.
Es ist bekannt, dass bei Schädigungen jeglicher Art - eben auch in der EAE - am Ort des Geschehens NG2 induziert wird, das hauptsächlich von OVZ exprimiert wird (130-132) und dann die Regeneration behindern kann. Gleichwohl fanden sich in einer EAE mit NG2 Knockout Mäusen keine signifikanten Unterschiede, weder im Krankheitsverlauf oder Zeitpunkt der Remission, noch in der De-/Remyelinisierungsrate, Astrozytenaktivierung oder der Leukozyteninfiltration (194). NG2 bleibt ein verlässlicher Marker für OVZ und da Sirt1 in eben diesen in der EAE vermehrt exprimiert wird, könnte es die suffiziente Differenzierung der OVZ zu reifen Oligodendrozyten supprimieren.

Als Kritikpunkt ist zu diskutieren, dass in der quantitativen Auswertung der Hirnschnitte unabhängig von dem genauen Grad der Demyelinisierung immer nur repräsentative Ausschnitte mit periventrikulären oder perivaskulären Zellinfiltrationen der weißen Substanz im Kleinhirn ausgewertet wurden. Allerdings konnte in anderen Publikationen gezeigt werden, dass auch in der *normal appearing white matter* (NAWM) sowohl Störungen der Oligodendrozyten, des Myelin und der Axone als auch eine Aktivierung der Mikroglia vorhanden sind (195;196).

4.3.4 Sirt1 Aktivität und Wirkung in der EAE

Wie oben beschrieben ist die gesteigerte Expression der Nikotinamid-Phosphoribosyl-Transferase (Nampt) im Kleinhirn unter EAE Bedingungen ein Hinweis auf die tatsächlich gesteigerte Aktivität der Sirt1 Reaktion. Zusätzlich gaben Färbungen mit azetyliertem H3K9 und H4K16 Aufschluss, in welchen Zellen Sirt1 an diesen Histonen aktiv war. In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass in über 60 Prozent aller Sirt1+ positiver Zellen ein niedriger Level an azetyliertem H3K9 vorlag. Ebenso hatten fast 70 Prozent aller Sirt1+

positiven Zellen einen niedrigen Level an azetyliertem H4K16. Dies könnte bedeuten, dass Sirt1 im Zellkern in diesen Zellen als Histondeazetylase während der EAE aktiv war und so das Expressionsmuster veränderte.

Interessant und wichtig ist aber, dass Sirt1 unabhängig von der Aktivität als Deazetylase weitere Funktionen wie zum Beispiel eine neuroprotektive Aufgabe zu besitzen scheint, da auch mutante Formen ohne Deazetylaseaktivität ebenso wie die Wildtypform zerebelläre Granulaneuronen vor induzierter Apoptose schützen konnten. Dieser protektive Effekt von Sirt1 konnte in diesem Modell auch durch pharmakologische Inhibitoren wie Sirtinol und Nikotinamid nicht aufgehoben werden (197). Dies heißt, dass die immunhistochemischen Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit nur im Hinblick auf die Quantität der Zellen analysiert werden dürfen und keine Aussage über die tatsächliche Art der Funktion während der EAE getroffen werden kann. Dazu wäre auf Grund des unabhängig von der Deazetylasefunktion zusätzlich vorhandenen Mechanismus auch eine gängige Sirt1 Aktivitätsmessung mittels Fluoreszenz nicht in der Lage gewesen, da diese ebenfalls mit der Deazetylaseaktivität arbeitet. Es wäre sehr aufschlussreich gewesen, die Anzahl der OVZ und die Myelinproduktion unter EAE Bedingungen in $Sirt1^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ zu evaluieren. Da aber unser Stamm mit seinem genetischen Hintergrund bisher nicht länger als wenige Tage postnatal überlebensfähig war, war es uns nicht möglich eine EAE in diesem Stamm zu induzieren. Theoretisch müssten diese $Sirt1^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Tiere dann mehr Myelin produzieren, höhere Remyelinisierungsraten aufweisen und verminderte klinische Symptome zeigen.
2013 konnten Rafalski et al. zeigen, dass Gehirn-spezifische Inaktivierung von Sirt1 bei Lysolecithin induzierter Demyelinisierung des Corpus callosum die Remyelinisierung verbessert und in der EAE den Beginn der klinischen Symptome verzögert (6).

Im Gegensatz dazu steht die Publikation von Zhang et al. (2008), da hier $Sirt1^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse (n=9, fünf bis sechs Generationen auf C57/BL6 zurück gezüchtet, ursprünglicher genetischer Hintergrund in der Publikation nicht genannt) eine größere Empfänglichkeit sowohl für passiv als auch aktiv induzierte EAE hatten, früher klinische Symptome auftraten und auch ein höherer klinischer Krankheitswert vorlag (198). Die Ursache wurde in dieser Arbeit einer verminderten T-Zelltoleranz und einer erhöhten T-Zellaktivierung in den $Sirt1^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäusen zugesprochen. Im Rückenmark zeigte sich eine vermehrte Infiltration von CD4+ Zellen. Allerdings wurden keine Immunfärbungen für Myelin beziehungsweise OVZ und Oligodendrozyten speziell im Kleinhirn durchgeführt.

Diese Ergebnisse bei einem kompletten Sirt1 Funktionsverlust in allen Geweben sind allerdings nicht mit der Situation bei Gehirn-spezifischer Inaktivierung von Sirt1 zu vergleichen.

Weiterhin zeigten viele Arbeiten, die Sirt1-Aktivatoren in entzündlichen Erkrankungen im ZNS eingesetzt haben, eine Verbesserung der klinischen Symptome und weniger ausgeprägte entzündliche Veränderungen im Gewebe (66). So zeigten Resveratrol/SRT 501-(Variante des Resveratrols) behandelte Mäuse geringere neurologische Defekte in der Remissionsphase der EAE (67;68). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Sirt1 in Neuronen zu reduzierten Entzündungszeichen, verminderter Demyelinisierung und reduzierter Apoptose führte. Dies könnte auf den starken antineuroinflammatorischen Effekt des Sirt1 durch Inhibition proinflammatorischer Zytokine (IFNγ) zurückzuführen sein (69).

Auf Grund der Erkenntnis, dass Sirt1 die Oligodendrozytendifferenzierung zu inhibieren scheint, könnte durch selektive Sirt1 Inaktivierung in den Oligodendrozytenvorläufern ein neuer Ansatz in der Therapie demyelinisierender Erkrankungen gefunden werden. Es ist aber bei einer therapeutischen Nutzung der Sirt1 Modulation eine selektive Zielansprache der Therapeutika unumgänglich.

5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen wichtigen Einfluss des Sirt1 auf die Oligodendrozytenzelllinie hin.
Sirt1 wurde in den Keimzellregionen (SVZ und SGZ) des adulten Mausgehirnes in multipotenten Stammzellen (Nestin/Sox2), aber auch in spezifischeren Vorläufern der Oligodendrozytenlinie (PDGFR) exprimiert. Weiterhin fand sich Sirt1 im Kleinhirnmark adulter Mausgehirne in differenzierten Oligodendrozyten, aber vor allem in den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten.

Es konnte gezeigt werden, dass Sirt1 *in vitro* (NVZ-Kulturen) die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Oligodendrozyten inhibiert. Die Abwesenheit funktionalen Sirt1 Proteins in $Sirt1^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ-Kulturen *in vitro* inhibierte im qRT-PCR Screening Zellzyklusinhibitoren (wie zum Beispiel p21 und PTEN) und Repressoren der OVZ Differenzierung (wie zum Beispiel Hes5 und insbesondere ID2) und sorgte so für OVZ Differenzierung (Mash1, Sox10 erhöht).
In der Immunhistochemie der $Sirt1^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ NVZ-Kulturen konnte dieser Effekt der Induktion der Oligodendrozytendifferenzierung bei Verlust des funktionalen Sirt1 Proteins ebenfalls gezeigt werden. Diese Rolle der Erhaltung der Oligodendrozytenvorläuferzellen beziehungsweise Inhibition der Oligodendrozytendifferenzierung von Sirt1 wird durch unsere Beobachtung unterstützt, dass $Sirt1^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Mäuse (E17) in den meisten Fällen eine deutlich verfrühte Expression der Myelinmarker (MBP, CNPase) zeigten. Die Stammzelllokalisation und –anzahl (Sox2) änderte sich in diesen Tieren nicht.

Sirt1 wurde unter den inflammatorischen Bedingungen der EAE im Kleinhirn induziert. Sirt1 fand sich aber nicht in der ortsständigen Mikroglia (Iba1) und nur vereinzelt in einwandernden Monozyten (Ly6c). Sirt1 wurde in den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (PDGFα, NG2) im Kleinhirnmark unter den Bedingungen der EAE signifikant vermehrt exprimiert. Auf Grund der Erkenntnis, dass Sirt1 die Oligodendrozytendifferenzierung zu inhibieren scheint, könnte durch selektive Sirt1 Inaktivierung in den Oligodendrozytenvorläufern ein neuer Ansatz in der Therapie demyelinisierender Erkrankungen gefunden werden.

6 Literaturverzeichnis

1. **Yang T, Sauve AA** 2006 NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. Springer AAPS J 8:E632-E643 Abbildung 1; with kind permission from Springer Science and Business Media

2. **Stromnes IM, Goverman JM** 2006 Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. Nat Protoc 1:1952-1960

3. **Lublin FD, Reingold SC** 1997 Guidelines for clinical trials of new therapeutic agents in multiple sclerosis: relations between study investigators, advisors, and sponsors. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology 48:572-574

4. **Arias-Carrion O** 2008 Basic mechanisms of rTMS: Implications in Parkinson's disease. Int Arch Med 1:2

5. **Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schroter F, Ninnemann O, Siegert E, Bendix I, Brustle O, Nitsch R, Zipp F, Aktas O** 2008 Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. Nat Cell Biol 10:385-394

6. **Rafalski VA, Ho PP, Brett JO, Ucar D, Dugas JC, Pollina EA, Chow LML, Ibrahim A, Baker SJ, Barres BA, Steinman L, Brunet A** 2013 Expansion of oligodendrocyte progenitor cells following SIRT1 inactivation in the adult brain. Nat Cell Biol 15:614-624

7. **Stüve O, Oksenberg J. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors.** 2006 Jan 10 [Updated 2010 May 11]. Multiple Sclerosis Overview. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1316/

8. **Sawcer S** 2008 The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. Brain 131:3118-3131

9. **Pierrot-Deseilligny C** 2009 Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis. J Neurol 256:1468-1479

10. **Banwell B, Krupp L, Kennedy J, Tellier R, Tenembaum S, Ness J, Belman A, Boiko A, Bykova O, Waubant E, Mah JK, Stoian C, Kremenchutzky M, Bardini MR, Ruggieri M, Rensel M, Hahn J, Weinstock-Guttman B, Yeh EA, Farrell K, Freedman M, Iivanainen M, Sevon M, Bhan V, Dilenge ME, Stephens D, Bar-Or A** 2007 Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. Lancet Neurol 6:773-781

11. **Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A** 2006 Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. JAMA 296:2832-2838

12. **Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH** 2008 B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. N Engl J Med 358:676-688

13. **Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, Al-Hayani A, Davies SN, Rasband MN, Olsson T, Moldenhauer A, Velhin S, Hohlfeld R, Meinl E, Linington C** 2007 Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. J Exp Med 204:2363-2372

14. **Rohkamm** 2008 Taschenatlas Neurologie. Thieme

15. **Bechtold DA, Kapoor R, Smith KJ** 2004 Axonal protection using flecainide in experimental autoimmune encephalomyelitis. Ann Neurol 55:607-616

16. **Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W** 2000 Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. Brain 123 (Pt 6):1174-1183

17. **Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte C, Nitsch R, Zipp F** 2007 Neuronal damage in brain inflammation. Arch Neurol 64:185-189

18. **Aktas O, Waiczies S, Zipp F** 2007 Neurodegeneration in autoimmune demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets. J Neuroimmunol 184:17-26

19. **Guthrie TC, Nelson DA** 1995 Influence of temperature changes on multiple sclerosis: critical review of mechanisms and research potential. J Neurol Sci 129:1-8

20. **Uhthoff W** 1890 Untersuchungen über die bei der multiplen Herdsklerose vorkommenden Augenstörungen. Arch Psychiatr Nervenkrankh; 21:305–410

21. **Gutrecht JA** 1989 Lhermitte's sign. From observation to eponym. Arch Neurol 46:557-558

22. **Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS** 2011 Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol 69:292-302

23. **Kabat EA, Wolf A, Bezer AE** 1947 The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. J Exp Med 85:117-130

24. **Kawakami N, Lassmann S, Li Z, Odoardi F, Ritter T, Ziemssen T, Klinkert WE, Ellwart JW, Bradl M, Krivacic K, Lassmann H, Ransohoff RM, Volk HD, Wekerle H, Linington C, Flugel A** 2004 The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 199:185-197

25. **Stromnes IM, Goverman JM** 2006 Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. Nat Protoc 1:1810-1819

26. **Gold R, Linington 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

27. **bromson-Leeman S, Bronson R, Luo Y, Berman M, Leeman R, Leeman J, Dorf M** 2004 T-cell properties determine disease site, clinical presentation, and cellular pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. Am J Pathol 165:1519-1533

28. **Zhou SR, Moscarello MA, Whitaker JN** 1995 The effects of citrullination or variable amino-terminus acylation on the encephalitogenicity of human myelin basic protein in the PL/J mouse. J Neuroimmunol 62:147-152

29. **Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K** 2000 Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. J Exp Med 192:393-404

30. **Bourquin C, Schubart A, Tobollik S, Mather I, Ogg S, Liblau R, Linington C** 2003 Selective unresponsiveness to conformational B cell epitopes of the myelin oligodendrocyte glycoprotein in H-2b mice. J Immunol 171:455-461

31. **Kornberg RD** 1974 Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science 184:868-871

32. **Luger K** 2003 Structure and dynamic behavior of nucleosomes. Curr Opin Genet Dev 13:127-135

33. **Workman JL, Kingston RE** 1998 Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. Annu Rev Biochem 67:545-579

34. **Strahl BD, Grant PA, Briggs SD, Sun ZW, Bone JR, Caldwell JA, Mollah S, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD** 2002 Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. Mol Cell Biol 22:1298-1306

35. **Sims RJ, III, Nishioka K, Reinberg D** 2003 Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. Trends Genet 19:629-639

36. **Strahl BD, Allis CD** 2000 The language of covalent histone modifications. Nature 403:41-45

37. **Ramadori G, Coppari R** 2010 Pharmacological manipulations of CNS sirtuins: Potential effects on metabolic homeostasis. Pharmacological Research 62:48-54

38. **Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y** 2007 Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD+-dependent histone deacetylase SIRT1. J Biol Chem 282:6823-6832

39. **Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D** 2004 Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. Mol Cell 16:93-105

40. **Vaziri H, Dessain SK, Ng EE, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA** 2001 hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. Cell 107:149-159

41. **Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF** 2003 Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 100:10794-10799

42. **Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C, Broxmeyer HE** 2008 SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. Cell Stem Cell 2:241-251

43. **Saunders LR, Verdin E** 2007 Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. Oncogene 26:5489-5504

44. **Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, Kim S, Xu X, Zheng Y, Chilton B, Jia R, Zheng ZM, Appella E, Wang XW, Ried T, Deng CX** 2008 Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. Cancer Cell 14:312-323

45. **Yi J, Luo J** 2010 SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. Biochim Biophys Acta 1804:1684-1689

46. **Flick F, Luscher B** 2012 Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications. Front Pharmacol 3:29

47. **Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y, Nemoto S, Finkel T, Gu W, Cress WD, Chen J** 2006 Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. Nat Cell Biol 8:1025-1031

48. **Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB** 2005 Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. Cell 123:437-448

49. **Chang KT, Min KT** 2002 Regulation of lifespan by histone deacetylase. Ageing Res Rev 1:313-326

50. **Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA** 2003 Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature 425:191-196

51. **Rogina B, Helfand SL** 2004 Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. Proc Natl Acad Sci U S A 101:15998-16003

52. **Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmuller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW, Sinclair DA** 2008 SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. Cell 135:907-918

53. **Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I** 2005 Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. Mol Biol Cell 16:4623-4635

54. **Tang BL, Chua CE** 2008 SIRT1 and neuronal diseases. Mol Aspects Med 29:187-200

55. **Takata T, Ishikawa F** 2003 Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in. Biochem Biophys Res Commun 301:250-257

56. **Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, hado De OR, Leid M, McBurney MW, Guarente L** 2004 Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature 429:771-776

57. **Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, Zhao W, Thiyagarajan M, MacGrogan D, Rodgers JT, Puigserver P, Sadoshima J, Deng H, Pedrini S, Gandy S, Sauve AA, Pasinetti GM** 2006 Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. J Biol Chem 281:21745-21754

58. **Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, Delalle I, Baur JA, Sui G, Armour SM, Puigserver P, Sinclair DA, Tsai LH** 2007 SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. EMBO J 26:3169-3179

59. **Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J** 2004 Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. Science 305:1010-1013

60. **Blander G, Olejnik J, Krzymanska-Olejnik E, McDonagh T, Haigis M, Yaffe MB, Guarente L** 2005 SIRT1 shows no substrate specificity in vitro. J Biol Chem 280:9780-9785

61. **Frye RA** 1999 Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. Biochem Biophys Res Commun 260:273-279

62. **Ramadori G, Lee CE, Bookout AL, Lee S, Williams KW, Anderson J, Elmquist JK, Coppari R** 2008 Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. J Neurosci 28:9989-9996

63. **Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Tanno M, Yagi H, Shimohama S, Sato M, Horio Y** 2008 Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. Proc Natl Acad Sci U S A 105:15599-15604

64. **Zipp F, Aktas O** 2006 The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. Trends Neurosci 29:518-527

65. **Monje ML, Toda H, Palmer TD** 2003 Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. Science 302:1760-1765

66. **Gallø M, Van Gool F, Leo O** 2011 Sirtuins and inflammation: Friends or foes? Biochemical Pharmacology 81:569-576

67. **Imler J, Petro TM** 2009 Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17+IL-10+ T cells, CD4- IFN-[gamma]+ cells, and decreased macrophage IL-6 expression. International Immunopharmacology 9:134-143

68. **Shindler KS, Ventura E, Dutt M, Elliott P, Fitzgerald DC, Rostami A** 2010 Oral resveratrol reduces neuronal damage in a model of multiple sclerosis. J Neuroophthalmol 30:328-339

69. **Nimmagadda VK, Bever CT, Vattikunta NR, Talat S, Ahmad V, Nagalla NK, Trisler D, Judge SIV, Royal W, Chandrasekaran K, Russell JW, Makar TK** 2013 Overexpression of SIRT1 Protein in Neurons Protects against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through Activation of Multiple SIRT1 Targets. The Journal of Immunology 190:4595-4607

70. **Zhang J, Chen J, Li Y, Cui X, Zheng X, Roberts C, Lu M, Elias SB, Chopp M** 2008 Niaspan treatment improves neurological functional recovery in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Neurobiology of Disease 32:273-280

71. **Hara N, Yamada K, Shibata T, Osago H, Hashimoto T, Tsuchiya M** 2007 Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. J Biol Chem 282:24574-24582

72. **Kaneko S, Wang J, Kaneko M, Yiu G, Hurrell JM, Chitnis T, Khoury SJ, He Z** 2006 Protecting Axonal Degeneration by Increasing Nicotinamide Adenine Dinucleotide Levels in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Models. The Journal of Neuroscience 26:9794-9804

73. **Berger F, Ramirez-Hernandez MH, Ziegler M** 2004 The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). Trends Biochem Sci 29:111-118

74. **Taylor DM, Maxwell MM, Luthi-Carter R, Kazantsev AG** 2008 Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases. Cell Mol Life Sci 65:4000-4018

75. **Haigis MC, Guarente LP** 2006 Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. Genes Dev 20:2913-2921

76. **North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E** 2003 The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD+-dependent tubulin deacetylase. Mol Cell 11:437-444

77. **Dryden SC, Nahhas FA, Nowak JE, Goustin AS, Tainsky MA** 2003 Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. Mol Cell Biol 23:3173-3185

78. **Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Yamada H, Kishimoto I, Yamaguchi S, Nakano S, Katoh M, Ito H, Oshimura M** 2007 SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. Oncogene 26:945-957

79. **Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R, Reinberg D** 2006 SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. Genes Dev 20:1256-1261

80. **Southwood CM, Peppi M, Dryden S, Tainsky MA, Gow A** 2007 Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. Neurochem Res 32:187-195

81. **Li W, Zhang B, Tang J, Cao Q, Wu Y, Wu C, Guo J, Ling EA, Liang F** 2007 Sirtuin 2, a Mammalian Homolog of Yeast Silent Information Regulator-2 Longevity Regulator, Is an Oligodendroglial Protein That Decelerates Cell Differentiation through Deacetylating {alpha}-Tubulin. J Neurosci 27:2606-2616

82. **Tang BL, Chua CEL** 2008 SIRT2, tubulin deacetylation, and oligodendroglia differentiation. Cell Motil Cytoskeleton 65:179-182

83. **Wallace DC** 2005 A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. Annu Rev Genet 39:359-407

84. **Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q** 2005 SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. J Biol Chem 280:13560-13567

85. **Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L** 2006 SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. Cell 126:941-954

86. **Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frendewey D, Auerbach W, Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R, Demple B, Yancopoulos GD, Alt FW** 2006 Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. Cell 124:315-329

87. **Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, McCord RA, Ongaigui KC, Boxer LD, Chang HY, Chua KF** 2009 SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. Cell 136:62-74

88. **Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L** 2005 Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. J Biol Chem 280:21313-21320

89. **Schwer B, Schumacher B, Lombard DB, Xiao C, Kurtev MV, Gao J, Schneider JI, Chai H, Bronson RT, Tsai LH, Deng CX, Alt FW** 2010 Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. Proceedings of the National Academy of Sciences 107:21790-21794

90. **Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L** 2006 Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. Genes Dev 20:1075-1080

91. **Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, Braun T, Bober E** 2008 Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. Circ Res 102:703-710

92. **Miron VE, Kuhlmann T, Antel JP** 2011 Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. Biochim Biophys Acta 1812:184-193

93. **Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R** 1993 The oligodendrocyte and its many cellular processes. Trends in Cell Biology 3:191-197

94. **Ruffini F, Arbour N, Blain M, Olivier A, Antel JP** 2004 Distinctive Properties of Human Adult Brain-Derived Myelin Progenitor Cells. The American Journal of Pathology 165:2167-2175

95. **Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C, Baron-Van EA** 2008 The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: from animal models to multiple sclerosis. J Neurol Sci 265:26-31

96. **Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW** 2001 The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. Trends in Neurosciences 24:39-47

97. **Wren D, Wolswijk G, Noble M** 1992 In vitro analysis of the origin and maintenance of O-2Aadult progenitor cells. The Journal of Cell Biology 116:167-176

98. **Liu J, Casaccia P** 2010 Epigenetic regulation of oligodendrocyte identity. Trends in Neurosciences 33:193-201

99. **Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR** 2009 HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. Nat Neurosci 12:829-838

100. **Liu A, Han YR, Li J, Sun D, Ouyang M, Plummer MR, Casaccia-Bonnefil P** 2007 The Glial or Neuronal Fate Choice of Oligodendrocyte Progenitors Is Modulated by Their Ability to Acquire an Epigenetic Memory. J Neurosci 27:7339-7343

101. **Lyssiotis CA, Walker J, Wu C, Kondo T, Schultz PG, Wu X** 2007 Inhibition of histone deacetylase activity induces developmental plasticity in oligodendrocyte precursor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 104:14982-14987

102. **Yu Y, Casaccia P, Lu QR** 2010 Shaping the oligodendrocyte identity by epigenetic control. Epigenetics 5:124-128

103. **Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, Schedl A, Wegner M** 2003 The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. Genes Dev 17:1677-1689

104. **Shen S, Sandoval J, Swiss VA, Li J, Dupree J, Franklin RJM, Casaccia-Bonnefil P** 2008 Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. Nat Neurosci 11:1024-1034

105. **Liu A, Li J, Marin-Husstege M, Kageyama R, Fan Y, Gelinas C, Casaccia-Bonnefil P** 2006 A molecular insight of Hes5-dependent inhibition of myelin gene expression: old partners and new players. EMBO J 25:4833-4842

106. **Samanta J, Kessler JA** 2004 Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. Development 131:4131-4142

107. **Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnefil P** 2002 Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. J Neurosci 22:10333-10345

108. **Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M** 1998 Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. J Neurosci 18:237-250

109. **Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U, Wegner M** 2002 Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. Genes Dev 16:165-170

110. **Finzsch M, Stolt CC, Lommes P, Wegner M** 2008 Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. Development 135:637-646

111. **Takada N, Kucenas S, Appel B** 2010 Sox10 is necessary for oligodendrocyte survival following axon wrapping. Glia 58:996-1006

112. **Ito Y, Wiese S, Funk N, Chittka A, Rossoll W, Bommel H, Watabe K, Wegner M, Sendtner M** 2006 Sox10 regulates ciliary neurotrophic factor gene expression in Schwann cells. Proc Natl Acad Sci U S A 103:7871-7876

113. **Barres BA, Burne JF, Holtmann B, Thoenen H, Sendtner M, Raff MC** 1996 Ciliary Neurotrophic Factor Enhances the Rate of Oligodendrocyte Generation. Mol Cell Neurosci 8:146-156

114. **Li H, Lu Y, Smith HK, Richardson WD** 2007 Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes. J Neurosci 27:14375-14382

115. **Kuspert M, Hammer A, Bosl MR, Wegner M** 2011 Olig2 regulates Sox10 expression in oligodendrocyte precursors through an evolutionary conserved distal enhancer. Nucleic Acids Res 39:1280-1293

116. **Li H, He Y, Richardson WD, Casaccia P** 2009 Two-tier transcriptional control of oligodendrocyte differentiation. Curr Opin Neurobiol 19:479-485

117. **Parras CM, Hunt C, Sugimori M, Nakafuku M, Rowitch D, Guillemot F** 2007 The proneural gene Mash1 specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes. J Neurosci 27:4233-4242

118. **Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F** 2004 Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. EMBO J 23:4495-4505

119. **Zhou Q, Choi G, Anderson DJ** 2001 The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. Neuron 31:791-807

120. **Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K, Nabeshima Y** 2002 The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. Curr Biol 12:1157-1163

121. **Ligon KL, Fancy SP, Franklin RJ, Rowitch DH** 2006 Olig gene function in CNS development and disease. Glia 54:1-10

122. **Buffo A, Vosko MR, Erturk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Gotz M** 2005 Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. Proc Natl Acad Sci U S A 102:18183-18188

123. **Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE** 2010 NG2+ CNS Glial Progenitors Remain Committed to the Oligodendrocyte Lineage in Postnatal Life and following Neurodegeneration. Neuron 68:668-681

124. **Wilson HC, Scolding NJ, Raine CS** 2006 Co-expression of PDGF [alpha] receptor and NG2 by oligodendrocyte precursors in human CNS and multiple sclerosis lesions. Journal of Neuroimmunology 176:162-173

125. **Grako KA, Ochiya T, Barritt D, Nishiyama A, Stallcup WB** 1999 PDGF (alpha)-receptor is unresponsive to PDGF-AA in aortic smooth muscle cells from the NG2 knockout mouse. J Cell Sci 112:905-915

126. **Baracskay KL, Kidd GJ, Miller RH, Trapp BD** 2007 NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells. Glia 55:1001-1010

127. **Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A** 2008 NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. Development 135:145-157

128. **Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X** 2009 Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. Nat Rev Neurosci 10:9-22

129. **Tripathi RB, Rivers LE, Young KM, Jamen F, Richardson WD** 2010 NG2 Glia Generate New Oligodendrocytes But Few Astrocytes in a Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Demyelinating Disease. J Neurosci 30:16383-16390

130. **Tan AM, Zhang W, Levine JM** 2005 NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. J Anat 207:717-725

131. **Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Chuai M, Imai Y, Takahashi H, Tanaka J** 2008 Accumulation of macrophage-like cells expressing NG2 proteoglycan and Iba1 in ischemic core of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab 28:149-163

132. **Zhu L, Lu J, Tay SS, Jiang H, He BP** 2010 Induced NG2 expressing microglia in the facial motor nucleus after facial nerve axotomy. Neuroscience 166:842-851

133. **Karram K, Goebbels S, Schwab M, Jennissen K, Seifert G, Steinh+ñuser C, Nave KA, Trotter J** 2008 NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. genesis 46:743-757

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

135. **Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD** 1988 Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. Nature 333:562-565

136. **Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD** 1999 Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. Development 126:457-467

137. **Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD** 1998 Oligodendrocyte Population Dynamics and the Role of PDGF In Vivo. Neuron 20:869-882

138. **Akiyama K, Ichinose S, Omori A, Sakurai Y, Asou H** 2002 Study of expression of myelin basic proteins (MBPs) in developing rat brain using a novel antibody reacting with four major isoforms of MBP. J Neurosci Res 68:19-28

139. **Gravel M, Peterson J, Yong VW, Kottis V, Trapp B, Braun PE** 1996 Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. Mol Cell Neurosci 7:453-466

140. **Dyer CA** 1993 Novel oligodendrocyte transmembrane signaling systems. Investigations utilizing antibodies as ligands. Mol Neurobiol 7:1-22

141. **Emery B, Agalliu D, Cahoy JD, Watkins TA, Dugas JC, Mulinyawe SB, Ibrahim A, Ligon KL, Rowitch DH, Barres BA** 2009 Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. Cell 138:172-185

142. **Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA** 1994 Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 368:753-756

143. **Wang Y, Sharpless N, Chang S** 2013 p16INK4a protects against dysfunctional telomere-induced ATR-dependent DNA damage responses. J Clin Invest 123:4489-4501

144. **Gartel AL, Radhakrishnan SK** 2005 Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. Cancer Res 65:3980-3985

145. **Doetsch F, Verdugo JM, Caille I, varez-Buylla A, Chao MV, Casaccia-Bonnefil P** 2002 Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis. J Neurosci 22:2255-2264

146. **varez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD** 2001 A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Nat Rev Neurosci 2:287-293

147. **Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der KD** 1999 Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. J Neurosci 19:4462-4471

148. **Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA** 2000 Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A 97:13883-13888

149. **Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, varez-Buylla A** 1997 Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci 17:5046-5061

150. **Doetsch F** 2003 A niche for adult neural stem cells. Curr Opin Genet Dev 13:543-550

151. **Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH** 1993 Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 90:3602-3606

152. **Palmer TD, Takahashi J, Gage FH** 1997 The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. Mol Cell Neurosci 8:389-404

153. **Seaberg RM, van der KD** 2002 Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. J Neurosci 22:1784-1793

154. **Seaberg RM, van der KD** 2003 Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. Trends Neurosci 26:125-131

155. **Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL** 1996 Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. J Neurosci 16:1091-1100

156. **Ciccolini F, Svendsen CN** 1998 Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. J Neurosci 18:7869-7880

157. **McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, Lansdorp PM, Lemieux M** 2003 The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. Mol Cell Biol 23:38-54

158. **Bernal J** 2005 Thyroid hormones and brain development. Vitam Horm 71:95-122

159. **Baas D, Bourbeau D, Sarlieve LL, Ittel ME, Dussault JH, Puymirat J** 1997 Oligodendrocyte maturation and progenitor cell proliferation are independently regulated by thyroid hormone. Glia 19:324-332

160. **Kaufman** 1998 The Atlas of Mouse Development. Academic Press

161. **King IL, Dickendesher TL, Segal BM** 2009 Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. Blood 113:3190-3197

162. **McKay R** 1997 Stem cells in the central nervous system. Science 276:66-71

163. **Michalczyk K, Ziman M** 2005 Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. Histol Histopathol 20:665-671

164. **Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Horio Y** 2005 Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: NAD-dependent histone deacetylase SIRT1 (Sir2alpha). J Pharmacol Sci 98:200-204

165. **Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di CA, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK** 2004 Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. Development 131:3805-3819

166. **Kempermann** 2006 Adult Neurogenesis: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain. Oxford University Press; 200

167. **Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G** 2003 Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. Mol Cell Neurosci 23:373-382

168. **Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, varez-Buylla A** 2001 Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J Neurosci 21:7153-7160

169. **Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G** 2003 Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. J Comp Neurol 467:455-463

170. **Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, varez-Buylla A** 2004 Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. J Comp Neurol 478:359-378

171. **Michan S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, Mervis RF, Chen J, Guerin KI, Smith LE, McBurney MW, Sinclair DA, Baudry M, de CR, Longo VD** 2010 SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. J Neurosci 30:9695-9707

172. **Marshall CA, Novitch BG, Goldman JE** 2005 Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. J Neurosci 25:7289-7298

173. **Chen Y, Miles DK, Hoang T, Shi J, Hurlock E, Kernie SG, Lu QR** 2008 The basic helix-loop-helix transcription factor olig2 is critical for reactive astrocyte proliferation after cortical injury. J Neurosci 28:10983-10989

174. **Pallas M, Pizarro JG, Gutierrez-Cuesta J, Crespo-Biel N, Alvira D, Tajes M, Yeste-Velasco M, Folch J, Canudas AM, Sureda FX, Ferrer I, Camins A** 2008 Modulation of SIRT1 expression in different neurodegenerative models and human pathologies. Neuroscience 154:1388-1397

175. **Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J** 2007 Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. Circ Res 100:1512-1521

176. **Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R** 2009 Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. Nature 460:587-591

177. **Kwon HS, Ott M** 2008 The ups and downs of SIRT1. Trends Biochem Sci 33:517-525

178. **Lafontaine-Lacasse M, Richard D, Picard F** 2010 Effects of age and gender on Sirt 1 mRNA expressions in the hypothalamus of the mouse. Neurosci Lett 480:1-3

179. **Sasaki T, Maier B, Bartke A, Scrable H** 2006 Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. Aging Cell 5:413-422

180. **Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y** 2004 Predominant expression of Sir2alpha, an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain. FEBS Lett 556:281-286

181. **Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R** 1990 A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 346:245-250

182. **Zappone MV, Galli R, Catena R, Meani N, De BS, Mattei E, Tiveron C, Vescovi AL, Lovell-Badge R, Ottolenghi S, Nicolis SK** 2000 Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. Development 127:2367-2382

183. **Shen S, Li J, Casaccia-Bonnefil P** 2005 Histone modifications affect timing of oligodendrocyte progenitor differentiation in the developing rat brain. J Cell Biol 169:577-589

184. **Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH** 2004 Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 101:16659-16664

185. **Cunliffe VT, Casaccia-Bonnefil P** 2006 Histone deacetylase 1 is essential for oligodendrocyte specification in the zebrafish CNS. Mech Dev 123:24-30

186. **Revollo JR, Grimm AA, Imai S** 2004 The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. J Biol Chem 279:50754-50763

187. **Zhang T, Berrocal JG, Frizzell KM, Gamble MJ, DuMond ME, Krishnakumar R, Yang T, Sauve AA, Kraus WL** 2009 Enzymes in the NAD+ salvage pathway regulate SIRT1 activity at target gene promoters. J Biol Chem 284:20408-20417

188. **van d, V, Ho C, O'Neil C, Barbosa N, Scott R, Cregan SP, Pickering JG** 2007 Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase. J Biol Chem 282:10841-10845

189. **Zhang J** 2003 Are poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 and deacetylation by Sir2 linked Bioessays 25:808-814

190. **Kolthur-Seetharam U, Dantzer F, McBurney MW, de MG, Sassone-Corsi P** 2006 Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage. Cell Cycle 5:873-877

191. **Kauppinen TM, Suh SW, Genain CP, Swanson RA** 2005 Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in a primate model of multiple sclerosis. J Neurosci Res 81:190-198

192. **Selvaraj V, Soundarapandian MM, Chechneva O, Williams AJ, Sidorov MK, Soulika AM, Pleasure DE, Deng W** 2009 PARP-1 deficiency increases the severity of disease in a mouse model of multiple sclerosis. J Biol Chem 284:26070-26084

193. **Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y** 2001 Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. Biochem Biophys Res Commun 286:292-297

194. **Moransard M, Dann A, Staszewski O, Fontana A, Prinz M, Suter T** 2011 NG2 expressed by macrophages and oligodendrocyte precursor cells is dispensable in experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain 134:1315-1330

195. **Allen IV, McQuaid S, Mirakhur M, Nevin G** 2001 Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis. Neurol Sci 22:141-144

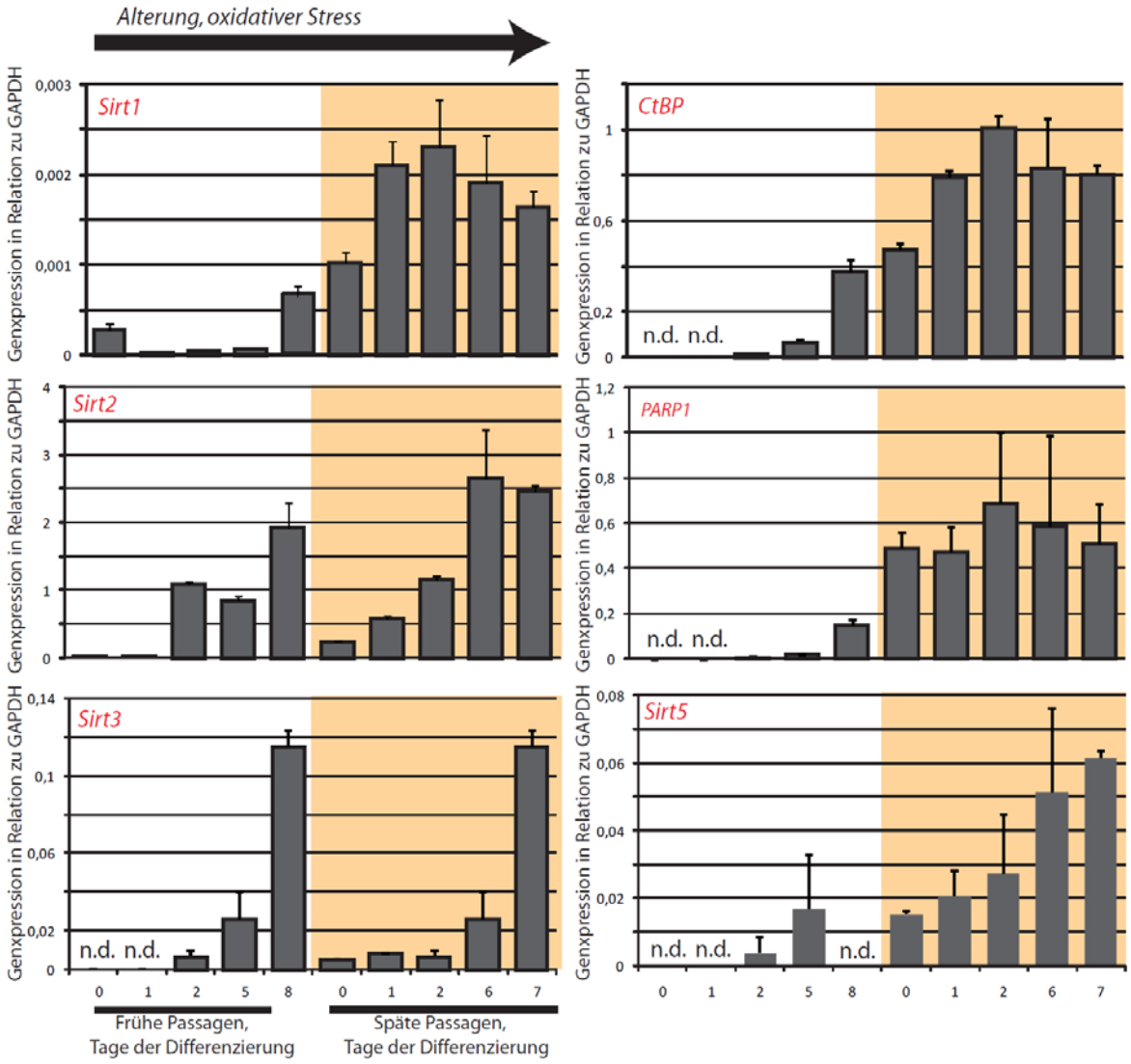
196. **Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG** 2000 Multiple sclerosis. N Engl J Med 343:938-952

197. **Pfister JA, Ma C, Morrison BE, D'Mello SR** 2008 Opposing effects of sirtuins on neuronal survival: SIRT1-mediated neuroprotection is independent of its deacetylase activity. PLoS One 3:e4090

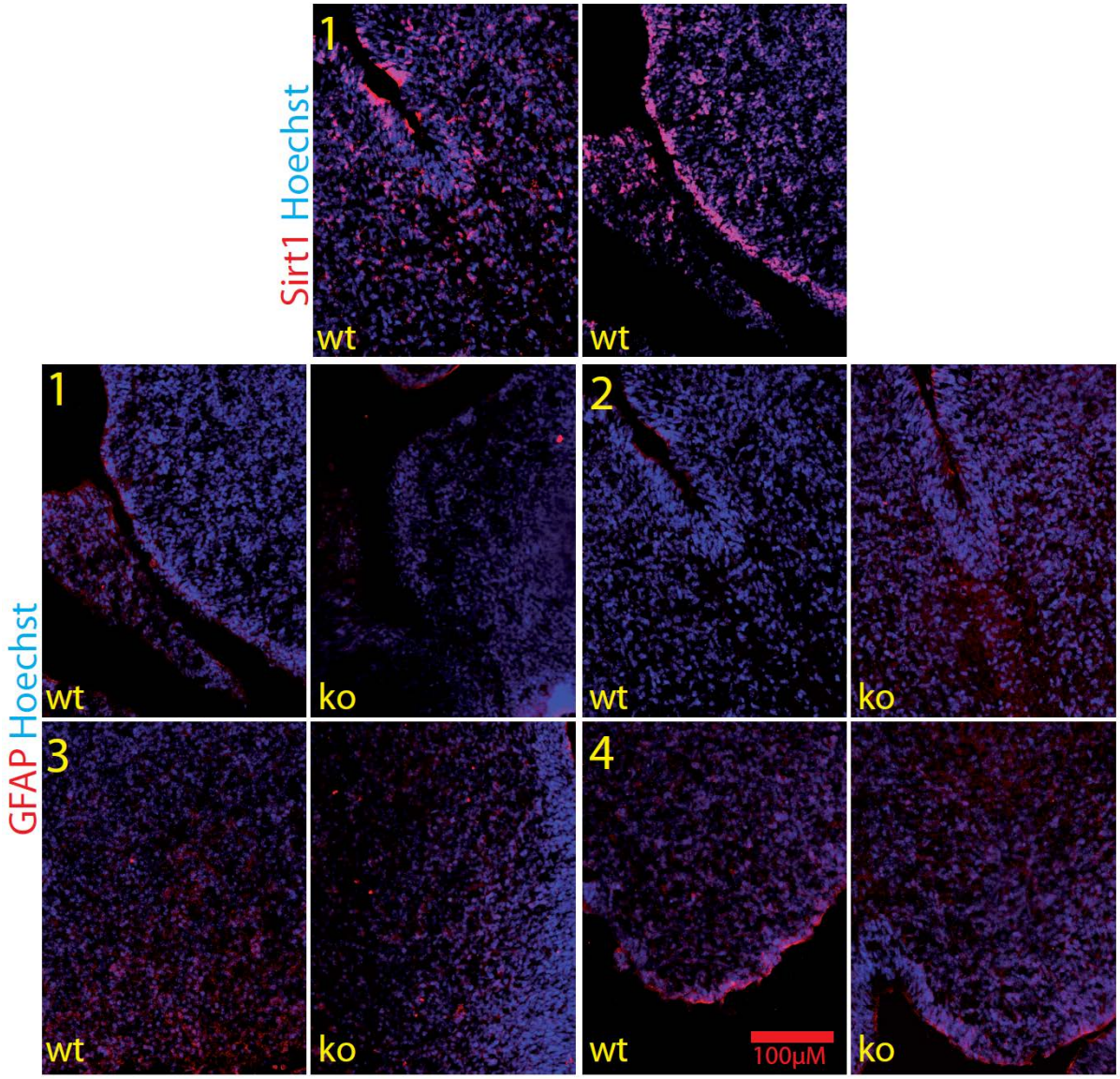
198. **Zhang J, Lee SM, Shannon S, Gao B, Chen W, Chen A, Divekar R, McBurney MW, Braley-Mullen H, Zaghouani H, Fang D** 2009 The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. J Clin Invest 119:3048-3058

7 Anhänge

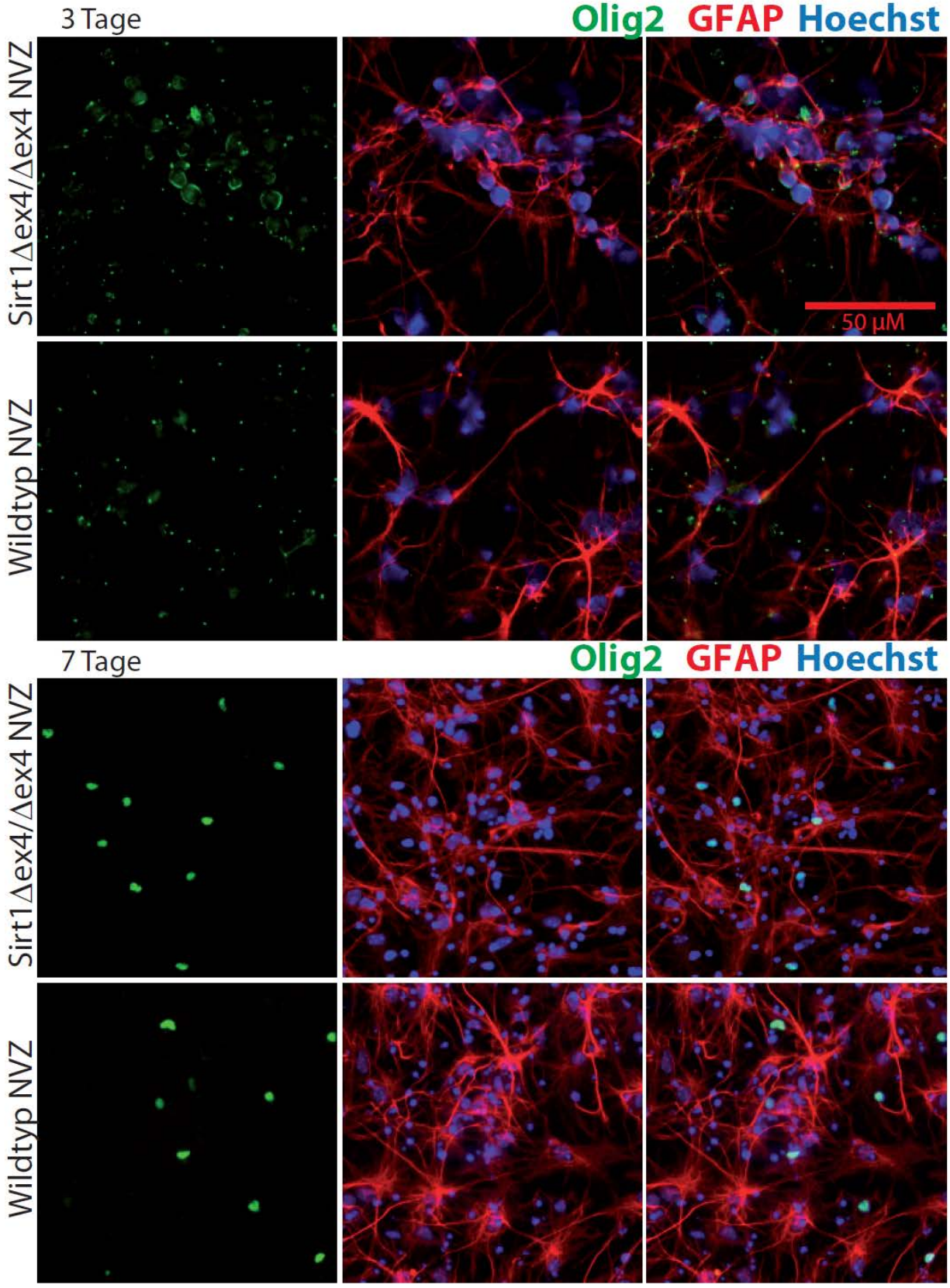
Anhang A: Alterung von NVZ in vitro. *RNA Expression in Relation zum housekeeping Gen GAPDH auf der y-Achse, die x-Achse zeigt die verschiedenen Zeitpunkte (n Tage der Differenzierung) in den frühen (weiß) und späten (gelb) Passagen.*



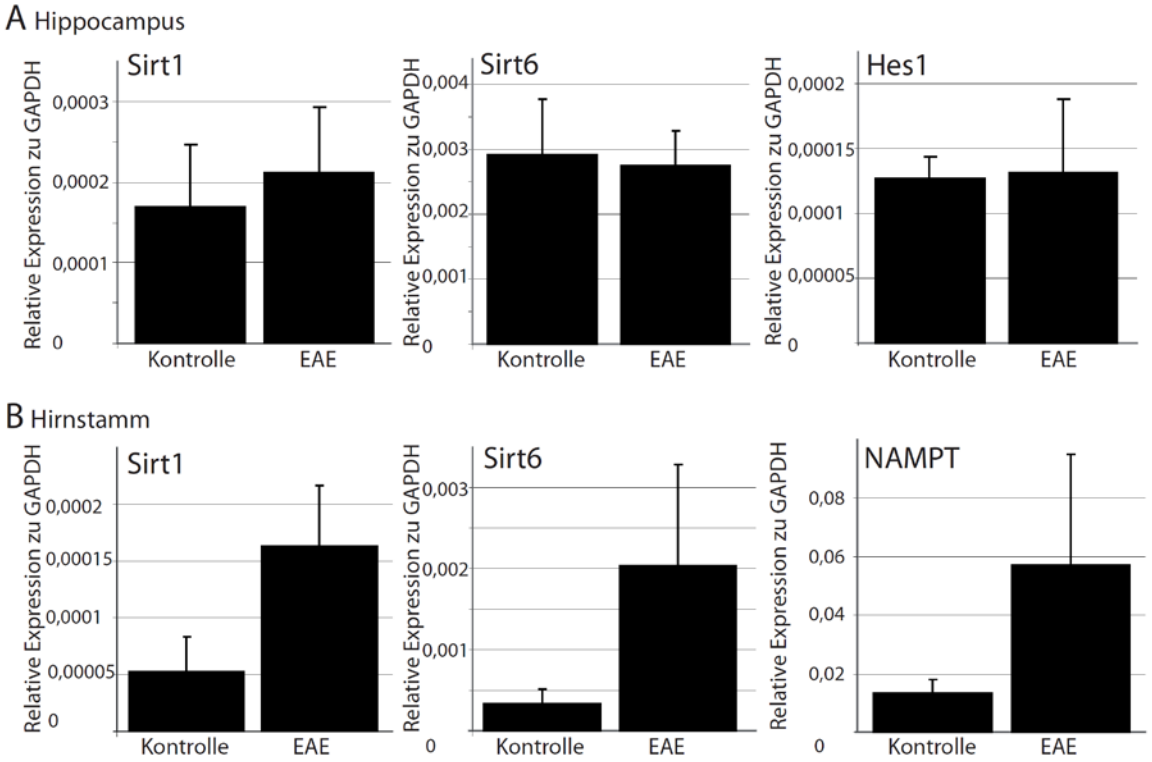
Anhang B: Vergleich Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ versus Wildtyp Embryos (E 16). *Sirt1 embryonal in der SVZ, aber auch im Parenchym. GFAP im Vergleich: Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ Embryonen versus Wildtyp Embryonen (E 16), jeweils repräsentative Bilder, 1: subependymale Zone des linken Foramen interventrikulare, 2: Übergang des vierten Ventrikel in den Zentralkanal des RM, 3: periventrikuläres Gewebe des dritten Ventrikels, 4: rostraler Anteil der zerebellären Anlage*



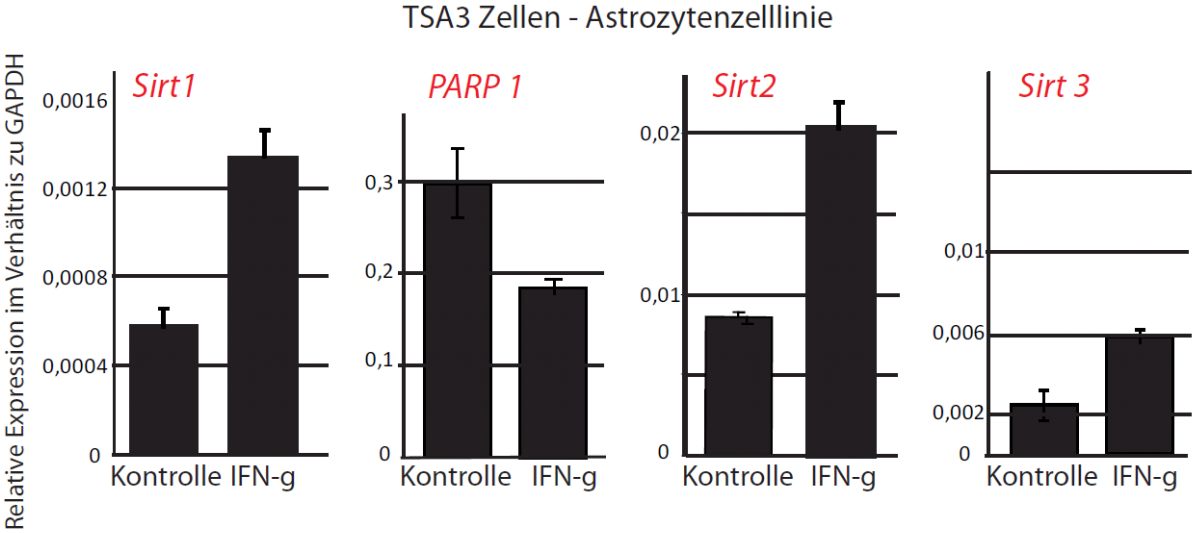
Anhang C: Olig2 und GFAP im Vergleich in Sirt1$^{\Delta ex4/\Delta ex4}$ versus Wildtyp NVZ *nach Differenzierung von drei beziehungsweise sieben Tagen Dauer. Es findet sich kein signifikanter Unterschied in der Markerexpression*



Anhang D: Geninduktion (qRT-PCR) *bei Experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), A: im Hippocampus (Kontrolle n = 3, EAE n = 6 Tiere) und B: im Hirnstamm (Kontrolle n = 3, EAE n = 5 Tiere); (Mittelwert ± SEM)* t-test: keine Signifikanz.



Anhang E: qRT-PCR Analysen aus TSA3 Zellen *Die Zellen wurden jeweils für fünf bis sechs Tage auf Poly-L-Ornithin kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit 100 U/ml Interferon γ stimuliert. In den TSA3 Zellen findet sich die Tendenz der Induktion der getesteten Situine und passend die Inhibition von PARP. Dies waren einzelne Experimente, deshalb kann nicht statistisch getestet werden.*



Danksagung

Hiermit danke ich Prof. Orhan Aktas für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit und vor allem die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgemeinschaft. Es wird für mich eine unvergessliche Zeit bleiben, die von viel Kameradschaft, hervorragender Betreuung, fachlicher Unterstützung und Lehre, reichlich Arbeit und kurzweiligen lab meetings geprägt war. Ich habe unendlich viel mitgenommen und würde es jederzeit wiederholen! Ich sage nur „Lab is open 7 days, 24 hours“.

Vor allem möchte ich Tim für seine unglaubliche Geduld, die vielen zeichnerischen Erklärungen und die großartige fachliche Betreuung danken. So war es mir möglich selbstständig und eigenverantwortlich zu arbeiten ohne den roten Faden zu verlieren. Ohne dich wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen! Vielen Dank, speziell auch für die Bereitstellung des Western Blots der Sirt1 Expression in der EAE.

Besonders danke ich auch Mary für die unermüdliche Genotypisierung der Zuchttiere. Ein herzlicher Dank geht auch an Fritzi, Reiner, Jens, Carsten und natürlich auch die anderen AG Aktas Mitglieder. Ich habe mich sehr wohl gefühlt und die Zeit mit euch genossen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die durch stetes Nachfragen nach dem Stand meiner Arbeit nicht unerheblich dazu beigetragen hat, dass diese jetzt niedergeschrieben ist. Die Perspektive der „Nicht-Mediziner/Naturwissenschaftler“ deckte den einen oder anderen interessanten Punkt auf, der dann aufgegriffen wurde.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

09.10.2013, Denise Eckstein