

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor/Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. S. Meuth

Der direkte Effekt von Fingolimod auf Astrozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Kathrin Fluck, geb. Al Khatib

2024

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Bernd C. Kieseier

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Für meinen Sohn Reinhard

Zusammenfassung

Diese Arbeit soll ein besseres Verständnis zur pathophysiologischen Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in Astrozyten, insbesondere in Hinblick auf die Neuroinflammation, schaffen.

Als erster oral verfügbarer Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulator wird Fingolimod bei der Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose (MS) eingesetzt.

Der periphere Effekt des Medikamentes zeichnet sich dadurch aus, dass über Hemmung der Sphingosin-1-Phosphat-(S1P) -Rezeptoren die Rezirkulation von Lymphozyten aus dem Lymphknoten vermindert wird. Dadurch gelangen weniger körpereigene Lymphozyten in das zentrale Nervensystem (ZNS), um im Rahmen der Multiplen Sklerose eine Entzündung auszulösen.

Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren werden in unterschiedlichen Zellen des Körpers, somit auch in Zellen des zentralen Nervensystems, exprimiert. Dies ermöglicht es Sphingosin-1-Phosphat-Modulatoren auch zentral zu wirken.

In dieser Arbeit wurde ein Modell gewählt, in welchem astrogliale Dissoziationskulturen aus dem cerebralen Cortex von neonatalen Wistar-Ratten verwendet wurden.

Das Expressionsmuster der Rezeptoren wurde im System in der Realtime Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) überprüft, in welchen sich vorwiegend die Subtypen 1 und 3 zeigten. In den PCRs wurde die mRNA der S1P-Rezeptoren nach Präinkubation mit Fingolimod herunterreguliert.

In den Calciumimaging-Experimenten wurde die Calciumantwort der Astrozyten gemessen, um die Signalkaskade der Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren an anderer Stelle zu untersuchen. Es zeigt sich pharmakologisch ein G-Protein-gekoppelter Mechanismus.

Die Signalkaskade wurde in den Experimenten an unterschiedlichen Punkten gehemmt oder induziert.

Es zeigte sich, dass Sphingosin-1-Phosphat in den Astrozytenkulturen über Sphingosin-1-Phosphat-3-Rezeptoren G-Protein gekoppelt über den Phospholipase C-Signalweg Calcium ausschüttet und dieser Weg durch Fingolimod gehemmt wird.

abstract

The intention of this paper is to create a better understanding about the pathophysiology of sphingosin-1-phosphate-receptors in astrocytes concerning the neuroinflammation.

Fingolimod is used as the first oral sphingosin-phosphate-receptor-modulator to treat the relapsing remitting multiple sclerosis.

The peripheral effect of the drug works as inhibition of sphingosin-1-phosphate-(s1p) -receptors which leads to a decreased recirculation of lymphocytes out of the lymphnode to the central nervous system. After reaching the cns they could cause an inflammation as part of multiple sclerosis.

Sphingosin-1-phosphate-receptors are expressed in different body cells, therefore in cells of the central nervous system too. This enables sphingosin-1-phosphate-modulators to have a central effect.

In this paper a model was chosen in which astroglial dissociation cultures of the cerebral cortex were used from neonatal wistar rats.

The expression of the receptors was verified in the realtime polymerase chain reaction (pcr). There were detected predominantly the subtypes 1 and 3.

In the pcr the mRNA of the s1p-receptors was downregulated after incubation with fingolimod.

In the calciumimaging experiments the calcium flow of the astrocytes was measured to analyse different points of the signalling cascade of the sphingosin-1-phosphate-receptors. It became apparant that pharmacological there was a g-protein linked mechanism.

The signalling cascade was induced or inhibited during the experiments in different points. In summary sphingosin-1-phosphate-3-receptors of the analysed astrocyte cultures are g-protein linked via sphingosin-1-phosphate receptors using the phospholipase c pathway which is inhibited by fingolimod.

Abkürzungsverzeichnis

CT = cycle threshold
DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Serum
DNA = Desoxyribonukleinsäure
DAG = Diacylglycerin
DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO = Dimethylsulfoxid
FBS = fetal bovine serum (fetales Kuhserum)
FTY = Fingolimod
GFAP = Glial fibroacid protein/ gliales fibrilläres saures Protein
IL- = Interleukin
IFN γ ,= Interferon Gamma
IP3= Inositoltrisphosphat
KIS= klinisch isoliertes Syndrom
mRNA= Messenger Ribonukleinsäure
MS = Multiple Sklerose
NO = Nitrogen monoxide/ Stickstoffmonoxid
PBS= phosphate buffered saline
PCR = pol0y chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
PDL= Poly-D-Lysine
PFA = Paraformaldehyde
PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PPMS= primäre progrediente Multiple Sklerose
RNA = Ribonukleinsäure
ROI = Region of interest
RRMS= relapsing remitting multiple sclerosis
S1P = Sphingosin-1-phosphat
SPMS= sekundäre progrediente Multiple Sklerose
TNF- α = Tumornekrosefaktor-Alpha
TNF- β = Tumornekrosefaktor-Beta
ZNS = zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Zellen im zentralen Nervensystem	1
1.1.1. Neuronen	1
1.1.2. Oligodendrozyten	2
1.1.3. Mikrogliazellen.....	2
1.1.4. NG2-Gliazellen.....	2
1.1.5. Astrozyten.....	2
1.2. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren	4
1.2.1. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in Astrozyten.....	6
1.3. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulatoren	7
1.3.1. W123	7
1.3.2. U73122	7
1.3.3. Fingolimod	8
1.4. Multiple Sklerose.....	9
1.5. Calcium signaling	11
1.5.1. Glutamatrezeptoren	11
1.5.2. Die Grundlagen des Calcium-Imagings	12
2. Ziele der Arbeit	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Materialien.....	15
3.2. Zellkultur	15
3.2.1. Präparation.....	15
3.2.2. Passagieren	17
3.3. DNA-Extraktion und PCR.....	18
3.3.1. RNA-Extraktion	18
3.3.2. cDNA-Herstellung.....	19
3.4. Calciumimaging	20
4. Ergebnisse	23
4.1. PCR.....	23
4.1.1. S1P-Rezeptorverteilungsmuster	23
4.1.2. S1P1-Rezeptorexpression im Vergleich	24
4.1.3. S1P3-Rezeptorexpression im Vergleich.....	25
4.2. Calciumimaging	26
4.2.1. S1P.....	27

4.2.2. S1P und W123 28	
4.2.3. S1P und U73122.....	29
4.2.4. S1P und Fingolimod.....	31
5. Diskussion.....	35
6. Schlussfolgerungen	41
7. Anhang.....	42
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	
9. Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die Zellen des ZNS.....	4
Abb. 2: Verteilungsmuster der Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren im ZNS	5
Abb. 3: Gq-Protein Signalweg	6
Abb. 4: Übersicht des Pathomechanismus bei Multipler Sklerose.....	10
Abb. 5: Verteilungsmuster der S1P-Rezeptoren (mRNA) bei unbehandelten Astrozyten..	23
Abb. 6: Vergleich der S1P1-Rezeptoren nach Inkubation mit DMSO und Fingolimod.....	25
Abb. 7: Vergleich der S1P3-Rezeptoren nach Inkubation mit DMSO und Fingolimod.....	26
Abb. 8: S1P-Signal der Astrozyten vor und nach Inhibition mit W123	28
Abb. 9: Inhibition unbehandelter Astrozyten mit U73122	31
Abb. 10: Stimulation von DMSO vorinkubierten Astrozyten mit S1P und Glutamat	32
Abb. 11: Stimulation von Fingolimod vorinkubierten Astrozyten mit S1P und Glutamat .	33
Abb. 12: Übersicht Astrozyten unter verschiedenen Umweltbedingungen	36

1. Einleitung

1.1. Die Zellen im zentralen Nervensystem

Im zentralen Nervensystem unterscheiden wir zwei große Gruppen von Zellen.

Zu der einen Gruppe zählen die Neurone, welche für die Erregungsweiterleitung zuständig sind und Aktionspotentiale ausbilden können. Zu den anderen Zellen gehört die heterogene Gruppe der Gliazellen. Die Gliazellen werden wiederum ausgehend von ihrer embryonalen Entwicklung in Zellen ektodermalen Ursprungs, zu denen Astrozyten, Oligodendrozyten und NG2 exprimierende Gliazellen gehören, sowie jene mesodermalen Ursprungs, zu denen die Mikrogliazellen gehören, eingeteilt [1]. Auf die einzelnen Zellgruppen wird im weiteren Verlauf kurz eingegangen und eine Übersichtszeichnung mit allen unten genannten Zellen befindet sich in Abbildung 1.

Das Gehirn wird vom restlichen Körper über die Blut-Hirn-Schranke getrennt.

Durch diese Barriere wird das Gehirn vor äußeren Einflüssen geschützt und es wird ein konstantes Milieu aufrechterhalten, in welchem die Signalverarbeitung ungestört stattfinden kann. Die Astrozyten spielen hierbei eine wichtige Rolle. Sie nehmen am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke teil und wirken daher als „Vermittler“ zwischen Gehirn und Peripherie [2, 3]. Obwohl das ZNS seine residenten Immunzellen, die Mikrogliazellen, besitzt, können Immunzellen aus der Peripherie die Bluthirnschranke überwinden und bei Entzündungsprozessen unterstützend und modulierend wirken [4].

Hierbei kann das periphere Immunsystem protektiv sein, indem es absterbende Zellen phagozytiert und Infektionen eindämmt. Es kann allerdings auch zellschädigend wirken, wenn es zelleigene Zellen angreift, wie dies bei der Multiplen Sklerose der Fall ist [4].

1.1.1. Neurone

Neurone dienen der Erregungsweiterleitung von Informationen. Äußere Einflüsse werden zum zentralen Nervensystem geleitet, dort verarbeitet und dann als verarbeitete Information wiederum an ihre Zielstruktur übermittelt.

Um eine möglichst reibungslose und schnelle Weiterleitung gewährleisten zu können, benötigen Neurone eine Isolierschicht, das Myelin. Diese Schicht wird teilweise

unterbrochen, um einen weiteren Ionenaustausch im Sinne der Saltatorischen Erregungsweiterleitung zu gewährleisten [5].

1.1.2. Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind im ZNS vor allem für die Myelinisierung der Axone zuständig, welche für eine Isolierung der Neurone und somit für eine bessere Erregungsweiterleitung sorgen [6]. Bei neurodegenerativen und inflammatorischen Ereignissen sind es Neurone und Oligodendrozyten, welche als Funktionsträger der Erregungsweiterleitung mit ihren umschließenden Myelinscheideproduzenten zugrunde gehen [7].

1.1.3. Mikrogliazellen

Mikrogliazellen sind die vorwiegend durch Abwehr charakterisierten Gliazellen [6]. Sie verfügen über Mechanismen wie Phagozytose, regulieren die Homöostase, sorgen aber gleichzeitig für ein Milieu, welches bereit ist Fremdkörper und Erreger abzuwehren. Im Akutstadium einer Schädigung im ZNS reagieren sie zunächst inflammatorisch, während sie im Spätstadium für Reparaturmechanismen zuständig sind [8].

1.1.4. NG2-Gliazellen

Diese Untergruppe der Gliazellen zeichnet sich dadurch aus, dass auf ihrer Oberfläche NG2 Proteoglykane detektiert werden können, und wird in der Literatur zusätzlich als „Polydendrozyt“ bezeichnet. NG2-Gliazellen werden als Vorläuferzellen anderer Gliazellen diskutiert und stellen so eine Möglichkeit der Remyelinierung vorgeschädigter Zellen dar [8-10].

1.1.5. Astrozyten

Eine besondere Bedeutung kommt den Astrozyten zu, da sie einige Funktionen aufweisen, die der Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS dienen.

Ihre kommunikativ vermittelnden Fähigkeiten werden ihnen durch die Nähe und Beteiligung am Aufbau der Bluthirnschranke ermöglicht [11].

Nach erfolgter Erregungsweiterleitung sind sie in der Lage sowohl den Neurotransmitter Glutamat, als auch überschüssiges Ammoniak wieder auf zu nehmen.

Das Wiederverwerten von Glutamat wird mithilfe der Astrozyten noch weiter ermöglicht, da sie zusätzlich über die Glutaminsynthetase Glutamat in Glutamin umwandeln und Glutamin wieder in den synaptischen Spalt entlassen können. Aus diesem ist es Neuronen möglich Glutamin wieder auf zu nehmen und erneut zu verwenden [12].

Beobachtungen zeigen, dass die Astrozytenzahl sowohl während der Entwicklung des Gehirns, als auch unter Umbruchereignissen wie Ischämien, Traumata und neurodegenerativen Erkrankungen steigt. In diesen intensiven Phasen, die eine Umstrukturierung und Entwicklung bedeuten, ist es folglich notwendig auf die Funktionen mehrerer Astrozyten zurückgreifen zu können.

Durch den Transport und z.T. auch das Metabolisieren von Aminosäuren und Glucose sorgen Astrozyten für einen Anstieg von Antioxidantien und freien Radikalfängern in ischämische Regionen [13]. Dies könnte ein möglicher Erklärungsansatz dafür sein, dass vermehrt Astrozyten nach Ischämien gebildet werden.

Die Bildung von Antioxidantien und freien Radikalfängern unterstützt die Hypothese, dass Astrozyten einen protektiven Effekt in Hinblick auf die Bildung von Karzinomen aufweisen können. Dazu wurde beschrieben, dass einige Tumore ihren Ursprung in der fehlerhaften Proliferation von Astrozyten über eine Stimulation durch bFGF (basic fibroblast growth factor) besitzen [14].

Die vermittelnde Stellung des einzelnen Astrozyten wird dadurch optimiert, dass Astrozyten mit ihren Ausläufern ganze Netzwerke mit umliegenden Zellen bilden.

Es scheint unterschiedliche Formen der Vernetzung zu geben. Beispiele hierzu sind „Gap junctions“, die benachbarten Astrozyten verbinden und somit eine verstärkte Wirkung auf die Homöostase des zentralen Nervensystems vermitteln.

Über „Hemichannels“ ist es Astrozyten nicht nur möglich untereinander, sondern auch direkt mit Neuronen in Kontakt zu treten.

Diese kommunikativen Fähigkeiten sprechen den Astrozyten eine Schlüsselrolle im zentralen Nervensystem zu. Über eine intrazelluläre Calciumausschüttung kann der Großteil der Astrozyten getriggert werden [15].

Es ist daher möglich über die Messung des Calciumanstiegs Aufschluss über die Zellaktivität geben zu können, wie es uns im Rahmen der im weiteren Verlauf dargelegten Ergebnisse der Calciumimaging Experimente möglich war.

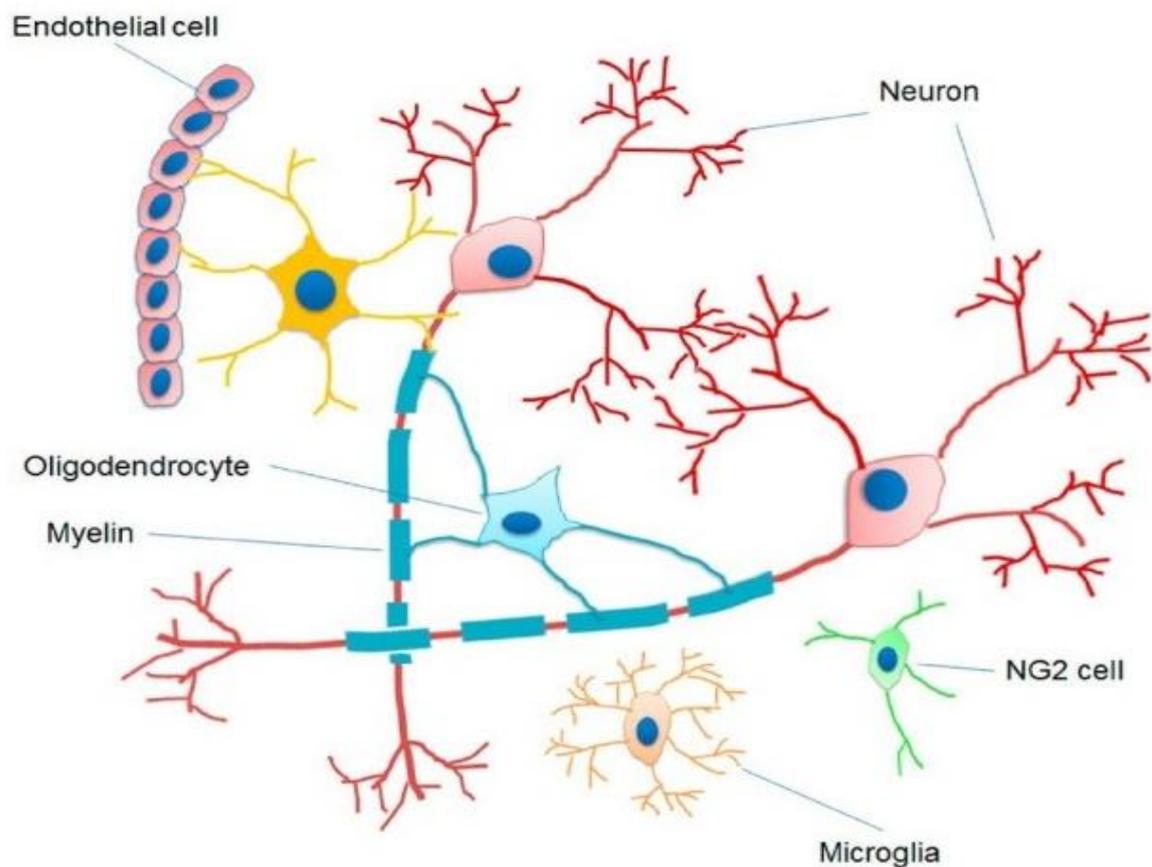


Abb. 1: Übersicht über die Zellen des ZNS [6] ; der Astrozyt ist gelb dargestellt.

1.2. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

Sphingosin kommt im Körper in Form eines Sphingolipids als Bestandteil der Zellmembran vor. Ein bekanntes Sphingolipid ist das Sphingomyelin, aus welchem durch Stoffwechselprozesse Sphingosin entsteht.

Sphingosin wird über die Sphingosinkinase unter ATP-Verbrauch zu Sphingosinphosphat umgewandelt. In seiner aktiven Form hat das Sphingosin-1-Phosphat zahlreiche Funktionen; darunter dient es dem Überleben der Zelle, der Proliferation, Migration und zeigt auch eine bedeutende Rolle in Bezug auf Differenzierungsprozesse [14].

Es kommt in einigen unterschiedlichen Zelltypen vor wie z.B. im Plasma von Erythrozyten, Mastzellen, Endothelzellen und Fibroblasten.

Eine Übersicht unterschiedlicher Zellen mit der Häufigkeit ihrer jeweiligen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren findet sich in Abbildung 2.

Insgesamt sind bisher die 5 Subtypen S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 und S1P5 beschrieben worden. Sie funktionieren über einen G-Protein gekoppelten Mechanismus und weisen 7 Transmembrandomänen auf.

Die Rezeptoruntertypen S1P1, S1P2 und S1P3 sind in mehreren Zellen des Körpers vorhanden. S1P4-Rezeptoren hingegen werden vorwiegend in Zellen des Immunsystems exprimiert. S1P5-Rezeptoren zeigen ihre Ausprägung vor allem in der Milz in Natürlichen Killerzellen und anderen Lymphozyten, sowie im ZNS, dort allerdings vermehrt auf Oligodendrozyten [16-18].

Bei T- und B-Zellen hingegen sind S1P1-Rezeptoren am prominentesten vertreten, die es T-Zellen ermöglichen wieder aus dem Lymphknoten zu wandern [19, 20]. In corticalen Astrozyten sind bisher vorwiegend die Rezeptoren S1P1, S1P2 und S1P3 vorbeschrieben worden [21].

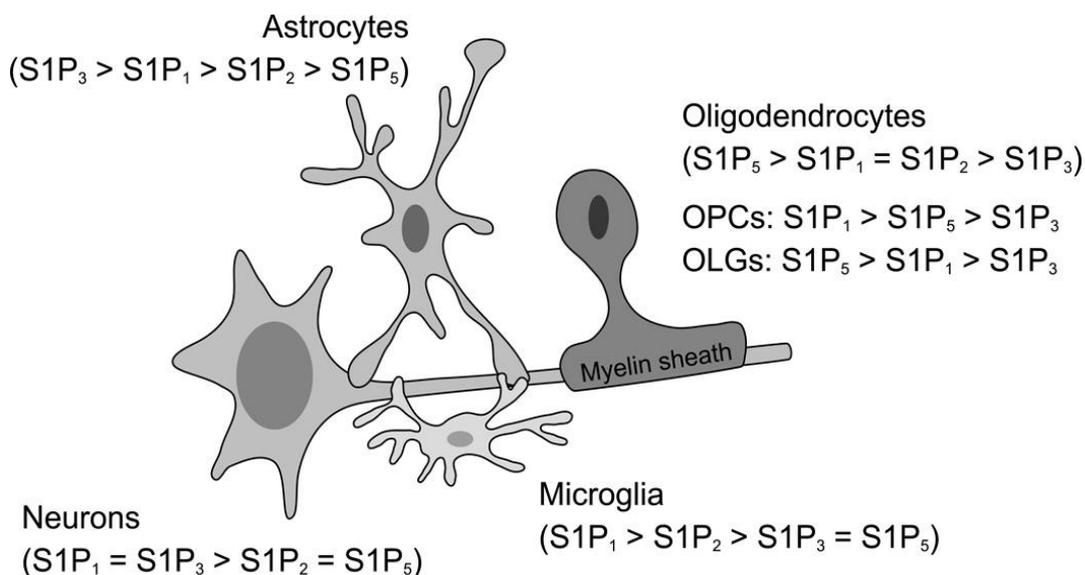


Abb. 2: Verteilungsmuster der Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren im ZNS [17, 22, 23]

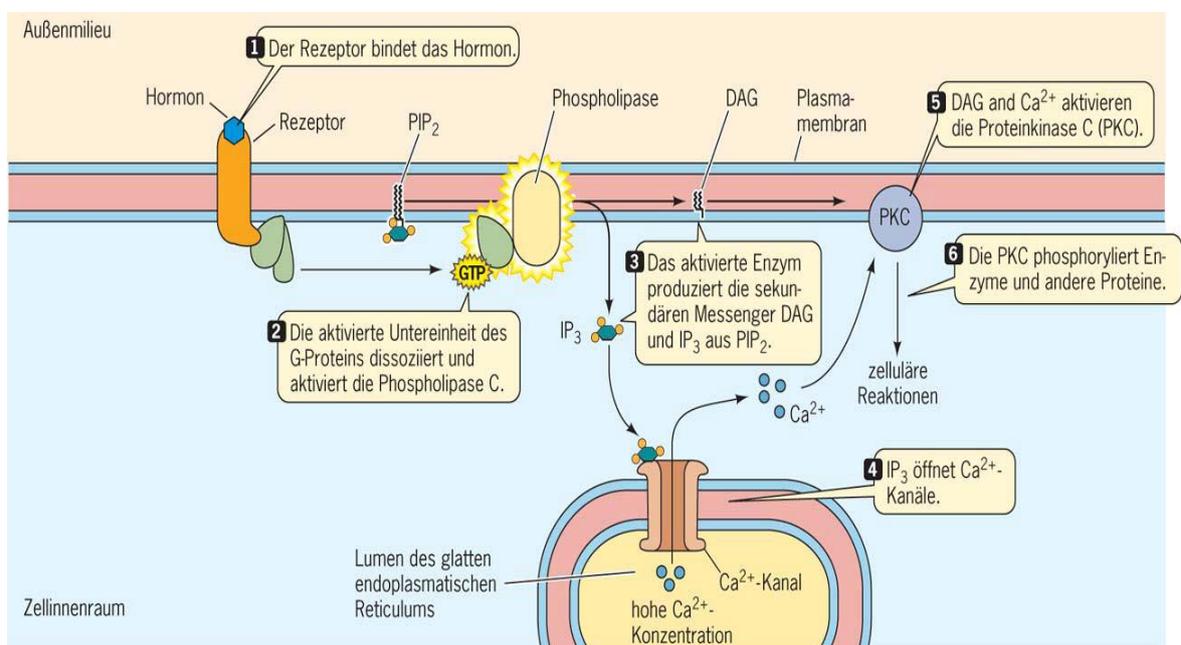
In der Signaltransduktion sind Unterschiede in der Signalkaskade zwischen den verschiedenen Sphingosin-Phosphat-Rezeptoren bekannt. So gibt es Hinweise darüber, dass der Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptor Gi-protein gekoppelt verlaufen soll, während die Signalwege des Sphingosin-1-Phosphat-3-Rezeptors Gi- und Gq-Protein vermittelt funktionieren [19].

Die Gi-Protein gekoppelte Kaskade verläuft über eine Hemmung der Adenylatcyclase, welche ATP in cAMP umwandelt. Da die cAMP-Bildung gehemmt wird, entsteht ein Abfall

der cAMP-Konzentration, durch welche die sonst durch cAMP aktivierte Proteinkinase A keine weiteren Enzyme und Proteine phosphorylieren kann [24].

Das Gq-Protein hingegen, siehe dazu auch Abbildung 3, induziert eine Aktivierung von Phospholipase C, welche aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) die Substrate Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) produziert.

IP₃ induziert eine Calciumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum, indem es seine Calciumkanäle öffnet. DAG und der Calciumanstieg bewirken nun eine Aktivierung der Proteinkinase C, welche weitere Reaktionen durch Phosphorylierung und somit Aktivierung von anderen Enzymen und Proteinen in Gang setzen kann [25].



Aus Purves/Sadava/Orians/Heller, Biologie, 7. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

Abb. 3: Gq-Protein Signalweg [25]

1.2.1. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in Astrozyten

Nachdem die allgemeine Funktionsweise und das Verteilungsmuster der ubiquitär im Körper vorhandenen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren erläutert wurden, wird im Folgenden auf Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in Astrozyten eingegangen.

Insbesondere bei der Untersuchung einer direkten Wirkung des Fingolimods auf Astrozyten, welche Gegenstand dieser Arbeit ist, muss vorerst die Frage geklärt werden, wie dieser funktionieren könnte.

Da Fingolimod bekanntermaßen auf periphere Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren seine Wirkung entfaltet, wäre es nun interessant zu recherchieren, wie sich bei Astrozyten das Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Expressionsmuster zusammensetzt und welche Funktionsweisen in einem homöostatischem, sowie in einem neuroinflammatorischen Milieu wie bei der Multiplen Sklerose in der Literatur bereits bekannt sind.

In Astrozyten werden überwiegend in absteigender Reihenfolge die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren des Subtyps 3, 1 und 2 exprimiert [26].

Prinzipiell lassen sich die allgemeinen Funktionen der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren, die die Erhaltung der Zelle, Proliferation und Migration von Zellen bedeuten [14], auch auf Astrozyten übertragen, welche bei gesunden Patienten zunächst positive Attribute sind.

Zur Untersuchung, inwiefern sich die Sphingosin-1-Phosphat-1- und Sphingosin-1-Phosphat-3-Rezeptor-Expression bei Multiple Sklerose verändert, wurden hierzu Autopsien von an MS erkrankten Patienten vorgenommen. In den Hirnarealen konnten in den MS-Läsionen vermehrt Astrozyten mit einer Überexpression von S1P1- und S1P3-Rezeptoren im Vergleich zu den Hirnarealen von Patienten ohne neuroinflammatorischen Erkrankungen festgestellt werden [19]. Desweiteren wurde ein neuroinflammatorisches Milieu, wie es bei der Multiplen Sklerose der Fall ist, künstlich erschaffen, um zu prüfen, wie sich die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren 1 und 3 von Astrozyten verändern. Nach Inkubation von humanen Astrozyten mit TNF-alpha ergab sich eine leichte Erhöhung der Expression des Subtyps 1 und eine starke Erhöhung des Subtyps 3 [19].

1.3. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulatoren

Zur besseren Differenzierung der Sphingosin-Phosphat-Rezeptoren in ihrer Aktivität, wurden spezifische Inhibitoren verwendet. Dies wird im Verlauf ein besseres Verständnis darüber geben, über welche Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptor-Untertypen und über welchen G-Protein-gekoppelten Mechanismus die in den Experimenten verwendeten Astrozyten funktionieren.

1.3.1. W123

W123 ist ein kompetitiver Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Antagonist des Subtypen 1, der die Ligand-Rezeptor-Aktion blockiert. Außerdem rekrutiert er die mitogenaktivierte Proteinkinase, welche über eine Signalkaskade mit weiteren Proteinkinasen Moleküle im Zytoplasma und im Kern aktiviert, die die Zellproliferation, Differenzierung von Zellen und

die Entwicklung initiieren [27]. Zusätzlich wird die Zellwanderung angeregt und die Rezeptoren werden internalisiert [28].

In der Literatur wird W123 als sehr spezifisch gegenüber Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren beschrieben [29].

1.3.2. U73122

U73122 beschreibt einen irreversiblen Phospholipase-C-Inhibitor.

Phospholipase C ist Bestandteil des Gq-Protein-gekoppelten Mechanismus, welcher ausführlich im vorangegangenen Kapitel behandelt wurde.

Über einen Calciumanstieg und das zuvor gebildete Substrat Diacylglycerin (DAG) wird die Proteinkinase C aktiviert und kann weitere Reaktionen über Phosphorylierung initiieren [25].

1.3.3. Fingolimod

Fingolimod ist ein orales Medikament zur Behandlung der Multiplen Sklerose, das seit 2010 als Eskalationstherapie bei der schubförmigen MS zugelassen worden ist [30].

Neben seinem initial beabsichtigten peripheren Effekt, die Rezirkulation von autoreaktiven T-Lymphozyten zu hemmen, ist auch ein zentraler neuroprotektiver Effekt beschrieben worden. Über seine lipophile Eigenschaft ist es Fingolimod möglich die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um dort wirken zu können. Der genaue Wirkmechanismus konnte hingegen noch nicht gänzlich geklärt werden [31].

Die Signalkaskade des Sphingosin-1-Phosphatrezeptors über seinen natürlichen Liganden Sphingosin-1-Phosphat wurde im vorangegangenen Kapitel beschrieben.

Im Vergleich dazu wirkt Fingolimod-Phosphat, die aktivierte Form des Fingolimods, als Sphingosin-1-Phosphatanalogon und bindet an den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor.

Zusätzlich zu seiner Funktion als S1P-Rezeptor-Analogon wirkt Fingolimod als „funktioneller Antagonist“, da die Rezeptoren irreversibel internalisiert werden, d.h. im Gegensatz zur physiologischen Reaktion die Verminderung der Rezeptoren trotz erneuter Stimulation weiterhin bestehen bleibt [32]. Hierbei soll Fingolimod, bis auf den Subtyp 2, auf alle anderen die Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren S1P1, S1P3, S1P4 und S1P5 wirken [33, 34].

Die eingangs beschriebene periphere Wirkung äußert sich insofern, dass T-Lymphozyten nicht mehr aus dem Lymphknoten über hochendotheliale Venolen emigrieren und nicht mehr über den Ductus Thoracicus ins Blut gelangen können [35]. Denn sonst könnten sie im Blut über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS gelangen, um dort zu einer Inflammation mit nachfolgender Schädigung zu führen.

Zusätzlich zu dem gerade genannten peripheren Effekt, wurde ein zentraler gegenüber Astrozyten und Oligodendrozyten beschrieben. Dieser lässt sich dadurch erklären, dass Fingolimod lipophile Eigenschaften besitzt und die Bluthirnschranke leichter passieren kann, um selbst ins ZNS zu gelangen und auch dort auf Astrozyten und Oligodendrozyten zu wirken, die ebenso Sphingosin-1-phosphatrezeptoren exprimieren [19, 31]. Fingolimod soll hierbei die S1P1- und S1P3-Rezeptoren in Astrozyten, sowie die S1P1- und S1P5-Rezeptoren in Oligodendrozyten verringern [31].

Zusammenfassend ist aus der Literatur nicht vollständig ersichtlich, wie Fingolimod letzten Endes funktioniert.

So wird das Medikament in einigen Quellen als kompletter S1P1-Agonist und partieller S1P3-Agonist beschrieben [19]. Fingolimod wirkt außerdem noch als funktioneller S1P1-Antagonist über Internalisierung der Rezeptoren und deren Verminderung an der Membranoberfläche [31]. Dies hat zur Folge, dass Lymphozyten nicht mehr auf S1P1 reagieren können und in sekundären lymphatischen Organen verbleiben. Außerdem reduziert Fingolimod die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen mit dem Ziel krankheitsbedingten Schüben entgegenzuwirken.

1.4. Multiple Sklerose

Multiple Sklerose gehört zu den neurodegenerativen autoimmunentzündlichen Erkrankungen. Die Entzündung geht mit einer gestörten Erregungsweiterleitung in demyelinisierten Axonen einher, da das Immunsystem sich gegen zelleigenes Myelin richtet [36]. Auch wenn der genaue Pathomechanismus nicht ganz geklärt ist, gibt es einen Ansatzpunkt, bei dem Lymphozyten nach Aktivierung in der Peripherie über Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren den Lymphknoten verlassen, um nach Passage der Blut-Hirn-Schranke ins zentrale Nervensystem zu gelangen (siehe dazu auch Abbildung 4) [37, 38].

Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke soll durch eine Zunahme der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, sowie der Adhäsionsmoleküle ermöglicht werden [39].

Hierbei scheinen überwiegend Th1- und Th17-Zellen durch eine Ausschüttung von Zytokinen wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF-}\beta$ und Interleukinen Mikrogliazellen und Makrophagen zu rekrutieren und für weitere Inflammation mit Demyelinisierung der Axone zu sorgen [36].

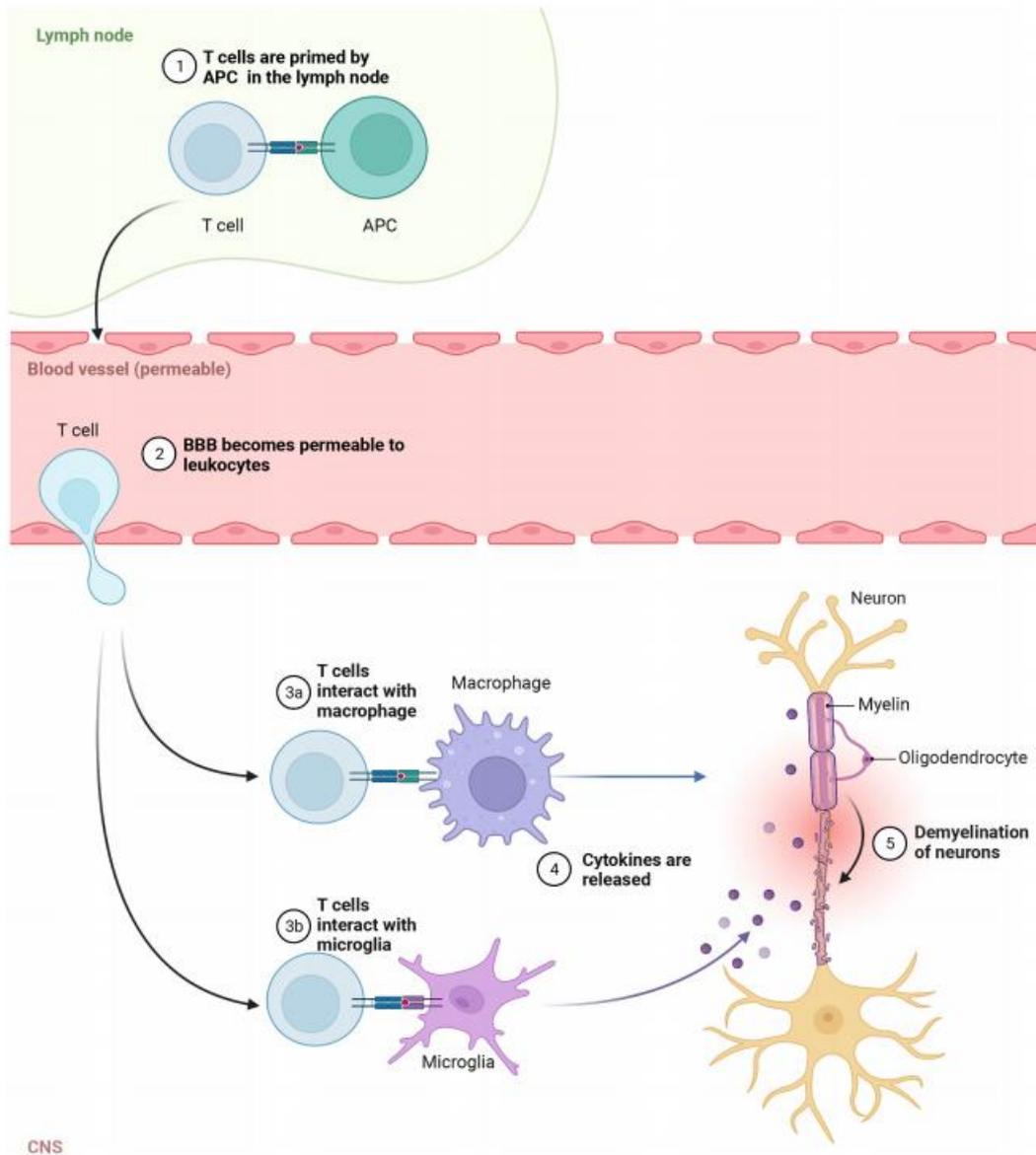


Abb. 4: Übersicht des Pathomechanismus bei Multipler Sklerose [36]

Die proinflammatorische Reaktion gegen das ZNS bewirkt außerdem, dass Gliazellen aktiviert werden und versuchen diesen Prozessen entgegen zu wirken, indem sie ihre Proliferation steigern und somit eine Gliose induzieren [40]. Durch Entzündungsprozesse getriggerte teilweise unkontrollierte Zellsteigerung bewirkt einen Verlust des funktionellen Gewebes im Tausch gegen Gliazellnarbengewebe.

Bei der Multiplen Sklerose erfolgt meist die Demyelinisierung des Cortex und der Kerne in der grauen Substanz. Die weiße Substanz kann allerdings auch durch diffuse Schädigungen betroffen sein [38].

Durch die Demyelinisierung der Axone und der teilweise direkten Schädigung der Axone kann die saltatorische Erregungsweiterleitung zwischen den Neuronen nicht mehr gewährleistet werden. Die Erregung wird also verlangsamt oder gar nicht mehr weitergeleitet. Die Symptome des Patienten hängen somit vom Ort der Schädigung ab.

Es gibt unterschiedliche Krankheitsformen, auf die im Rahmen der Arbeit nicht näher eingegangen wird. Fingolimod wird zur Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt.

1.5. Calcium signaling

Astrozyten generieren ihre Signalantworten überwiegend Calciumvermittelt [41].

Neurotransmitter wie Glutamat oder GABA können als Liganden an Rezeptoren von Astrozyten binden, wodurch eine intrazelluläre Calciumerhöhung erfolgen kann [42].

Diese Calciumaktivität lässt sich in den Calciumimaging-Experimenten durch Messkurven graphisch darstellen. Im weiteren Verlauf wird konkreter beschrieben, wie die bei Astrozyten ausgebildeten Rezeptoren aufgebaut sind und wie diese funktionieren.

Dies soll das Verständnis darüber erleichtern, an welchen Punkten der Signalkaskade eine Inhibition oder eine Stimulation in den Calciumimaging-Experimenten erfolgt und wie dies interpretiert werden kann.

1.5.1. Glutamatrezeptoren

Die Glutamatrezeptoren werden in metabotrope und ionotrope Rezeptoren unterteilt. Ionotrope Glutamatrezeptoren wie NMDA- und Ampa-Kainat-Rezeptoren zeichnen sich dadurch aus, dass ein Ligand an einen Rezeptor bindet und diese Interaktion eine Ionenkanalöffnung zur Folge hat [43]. In dieser Arbeit spielen sie eine untergeordnetere Rolle.

Die metabotropen Glutamatrezeptoren sind G-proteingekoppelt und in weitere Untergruppen unterteilt. Insgesamt sind bisher 8 Untergruppen bekannt und beschrieben. In ihrer Funktionalität sind sie allerdings in 3 große Gruppen unterteilt.

Metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I zeichnen sich dadurch aus, dass sie Gq-gekoppelt sind und deshalb über den zuvor detailliert beschriebenen Phospholipase C-Weg eine Calciumerhöhung bewirken [44]. Zur Gruppe I gehören die Subtypen mGluR1 und mGluR5 [45]. Die Rezeptoren der Gruppe II finden über den Gi-Protein-Weg, also die Inhibition der Adenylatcyclase, statt. Dazu gehören die Subtypen mGluR2 und mGluR3 und bewirken eine Calciumsenkung [44]. Als letzte Gruppe (III) gelten die Rezeptoren mGluR4, mGluR6, mGluR7 und mGluR8, welche ebenso Gi-proteingekoppelt funktionieren [44, 46]. Unter den Glutamatrezeptoren sind bereits Ca^{2+} Kanäle vom L-Typ, NMDA Rezeptoren und metabotrope Glutamatrezeptoren, vor allem der Gruppe I und II bekannt [13].

Astrozyten wirken über die metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I [47], die Gq-proteingekoppelt funktionieren und für eine Calciumausschüttung sorgen.

In den Calcium-Imaging Experimenten kann eine Erhöhung der Calciumkonzentration gemessen werden und daher Aufschluss über die Aktivität geben.

1.5.2. Die Grundlagen des Calcium-Imagings

Das Calcium-Imaging beschreibt eine Methode, durch die es gelingt die Calciumaktivität in lebenden Zellen zu messen.

Zur Darstellung des Calciums werden die Polypeptide Aequorin und GFP („green fluorescent protein“) als Calciumindikatoren verwendet.

Zuvor wurden die Proteine einzeln genutzt. Die Kombination der beiden Stoffe zeigte sich jedoch als effizienter, da ein stärkeres Lichtsignal erzeugt werden konnte [48].

Aequorin ist ein Protein, welches seinen Ursprung in der Quallenart *Aequorea victoria* hat. Es besitzt vier Domänen, von denen drei Calcium binden können [49].

Die funktionelle Gruppe des Aequorins ist das Coelenterazin, welches nach Bindung von Calcium oxidiert wird. Daraufhin werden CO_2 und blaues Licht freigesetzt [49].

Wenn die Kombination aus Aequorin und GFP genutzt wird, verändert sich das Lichtsignal. Das Ca^{2+} sensitive Photoprotein Aequorin überträgt dem GFP Energie, damit ein grünes Lichtsignal von 510 nm nach der Calciumbindung ausgesendet werden kann [48].

Die Nutzung des Aequorins bietet in der Messung der Calciumkonzentration einige Vorteile. So zeigt sich Aequorin bei Schwankungen des pH-Werts stabil und erscheint gegenüber anderen zweiwertigen Ionen nicht so sensitiv wie gegenüber Calcium [50].

Besonders bei Astrozyten erscheint Calciumimaging als Methode geeignet, da sie wie Neuronen auch bei Signalen oft mit einer Calciumantwort reagieren.

Erhöhungen der zytosolischen Calciumkonzentration induzieren intrazelluläre Signalkaskaden bei Astrozyten. Dies ist durch metabotrope Rezeptoren möglich, die sich in ihrer Membran von Astrozyten befinden. Viele von diesen Rezeptoren wirken über die Phospholipase C-Kaskade, welche aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) die Substrate Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) produziert.

IP₃ induziert eine Calciumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum, indem es seine Calciumkanäle öffnet. DAG und der Calciumanstieg bewirken nun eine Aktivierung der Proteinkinase C, welche weitere Reaktionen durch Phosphorylierung und somit Aktivierung von anderen Enzymen und Proteinen in Gang setzen kann [25].

Das Calciumsignal in Astrozyten kann sogar über die einzelne Reaktion hinaus fortbestehen und sich über benachbarte Astrozyten ausbreiten [51].

2. Ziele der Arbeit

Das für die schubförmige Multiple Sklerose zugelassene Fingolimod ist das erste oral verfügbare Medikament und wird bereits seit Jahren erforscht. Dennoch ist der genaue Mechanismus noch immer nicht geklärt. Oft als Sphingosin-1-Phosphat-Modulator bezeichnet, soll Fingolimod vornehmlich als Sphingosin-1-Phosphatanalogon autoreaktive T-Lymphozyten daran hindern aus dem Lymphknoten ins ZNS zu migrieren. Durch eine zusätzliche Internalisierung der Rezeptoren kann die Rezeptordichte verringert und somit längerfristig ein inhibitorischer Effekt erzielt werden. Da zudem ein direkt auf das zentrale Nervensystem protektiver Effekt des Fingolimods bekannt ist, galt es nun zu erarbeiten über welche Mechanismen dieser funktionieren soll. Astrozyten halten eine herausstechende Stellung in Hinblick auf die Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS inne, daher wurden eigene Astrozytenkulturen aus Wistarratten angelegt, um ein geeignetes Zellmodell zu etablieren.

Zunächst galt es das Expressionsmuster der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren nachzuvollziehen, um im Anschluss, nach Inkubation der Kulturen mit Fingolimod, Aussagen über die Wirkungsweise von Fingolimod auf Astrozyten zunächst im Rahmen der PCRs auf Rezeptorebene zu gewinnen. Es galt zu zeigen, dass vermehrt die Subtypen 1 und 3 bei Astrozyten exprimiert werden, auf welche bei Fingolimod bereits eine periphere Wirkung bekannt ist. Bei den Calciumimaging-Experimenten wurde das Calciumsignal der Astrozyten nach Stimulation und Hemmung mit S1P, Fingolimod, W123, U73122 und Glutamat gemessen. Ziel dieser Experimente war es nochmal auf anderem Wege zu bestätigen, dass die Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren 1 und 3 vornehmlich bei Astrozyten exprimiert werden. Zudem sollte überprüft werden, ob Astrozyten einem Gq-Protein-vermittelten Mechanismus unterliegen, über den S1P3-Rezeptoren funktionieren.

Neben der Untersuchungen der Rezeptoren und der G-Protein-gekoppelten Mechanismen bleibt die Frage offen, welche Rolle Astrozyten in Hinblick auf Multiple Sklerose erkrankte Menschen nun spielen und inwiefern Fingolimod einen zentralen protektiven Effekt erzielen soll.

Auf der einen Seite werden nämlich in der Literatur Astrozyten neuroprotektive Fähigkeiten zugesprochen, die sie durchaus in einem homöostatischen Milieu besitzen.

Auf der anderen Seite soll die durch MS bestehende Inflammation zu einer Aktivierung eines neurotoxischen Subtyps der Astrozyten, dem sogenannten „A1 Astrozyten“ führen, der selbst zur Neuroinflammation führt, indem er neurotoxische Zytokine sezerniert.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Eine genaue Auflistung aller Materialien befindet sich im Anhang.

Das für die Zellkultur verwendete Material wurde aus P0-P2 alten Wistar Ratten gewonnen. Die Tiere wurden von der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bereitgestellt, in welcher auch die Berechtigung an der Arbeit mit Tieren erworben wurde.

Die Projektnummer lautet O12/06.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Präparation

Es werden Gehirne von 0-2 Tage alten Wistar-Ratten präpariert, um Zellkulturen anzulegen [52-54].

Die Tiere werden jeweils für 2 Minuten mit Isofluran narkotisiert. Sobald die Eigenreflexe der Tiere nicht mehr erkennbar sind und diese tief schlafen, werden die Tiere aus dem mit Isofluran durchfluteten Plastikbecher (mit Deckel) entnommen, mit dem ganzen Körper für wenige Sekunden in 70%iges Ethanol getränkt, mit einer Pinzette an der Nackenfalte hochgehoben und mithilfe einer großen Präparierschere dekapitiert.

Bis auf den Kopf wird das restliche Gewebe entsorgt.

Bei der weiteren Präparation wird der Kopf auf einer sterilen Kompresse mit der Schnauze nach links und beiden Augen zur Seite abgelegt. Alle verwendeten Präparationsbestecke werden vor Benutzung im Rattengewebe zuerst in 70% Ethanol, dann hintereinander in je zwei mit 50 ml PBS gefüllte Falcons und ein mit 50 ml DMEM gefülltes Falcon eingetaucht. Zunächst wird mit der Hand des Präparators die Haut der Ratte schnauzwärts verschoben. Dann wird mit einer geraden Mikropinzette durch die umgeklappte Haut und die beiden Augen gestochen, um Halt für das weitere Procedere zu gewinnen. Im Anschluss daran werden präzise Schnitte mithilfe der kleinen Präparationsschere an beiden Seiten sowie der Sagittallinie an der Schädelkalotte gesetzt.

Mit der stumpfen gebogenen Pinzette wird die Kalotte abgezogen und entfernt, sodass das Gehirn mit seinen beiden Hemisphären freiliegt. Anschließend wird der Spatel benutzt und unterhalb des Gehirns hin- und her bewegt, um das gesamte Gehirn zu lösen. Mithilfe einer stumpfen gebogenen Pinzette wird das Gehirn in eine neue Petrischale überführt. Das restliche Gewebe auf der sterilen Kompresse wird entsorgt.

Das Kleinhirn wird mit einer spitzen gebogenen Pinzette fixiert, um mit dem Spatel das Gehirn in seine beiden Hemisphären zu spalten.

Wenn dies erfolgt ist, finden die nächsten Schritte unter dem Mikroskop statt. Mit einem Skalpell wird der Schnitt möglichst oberhalb der Seitenventrikel angesetzt, gesetzt und mit einer kleinen spitzen gebogenen Pinzette durchgezogen. Die entstandenen abgetrennten Hemisphärenstücke werden in eine neue Petrischale mit vorher vorbereiteten DMEM-Tropfen übertragen.

Die Meningen werden mithilfe einer stumpfen und einer spitzen gebogenen Pinzette abgezogen. Die Orientierung erfolgt an der Seite der Hemisphäre, an der sich die Gefäße befinden. Nach dem Entfernen der Meningen werden die Hemisphären unter Verwendung des Skalpells und der spitzen gebogenen Pinzette grob zerkleinert und dann feiner unter Verwendung einer spitzen gebogenen Pinzette. Schließlich werden die präparierten Gewebestückchen mit nun umgedreht verwendeter stumpfer gebogener Pinzette aufgenommen und in ein auf 50 ml mit DMEM gefülltes Falcon übertragen. Das mit den Zellen und DMEM gefüllte Falcon wird bei 2000 rpm für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss daran wird der Überstand abgesaugt und 1ml Wachstumsmedium hinzugefügt. Als nächster Schritt folgt das Titrieren, bei welchem Glaspipetten unter dem Brenner so modifiziert werden, dass sich die Öffnung der Pipettenspitze verkleinert. Unter Verwendung von nun im Öffnungsdurchmesser angepassten Glaspipetten, wird das Zell-Mediumgemisch hin- und herpipettiert, sodass sich die Gewebezellen soweit verkleinern, bis sich eine homogenere Flüssigkeit bildet.

Dem Zell-Mediumgemisch werden 9ml Medium hinzugefügt, es wird kurz durchmischt und die insgesamt 10 ml werden durch einen 60µm-Filter in ein Becherglas pipettiert. Bei zwei präparierten Tieren werden vier Zellkulturflaschen mit 17,5 ml Medium vorbereitet. Pro Kulturflasche werden dann 2,5 ml vom Zell-Mediumgemisch hinzugegeben, sodass das Endvolumen pro Kulturflasche 20 ml beträgt.

Nach Beendigung der Präparation werden die Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ gelagert. Der Mediumwechsel erfolgt alle zwei Tage [53, 54].

3.2.2. Passagieren

Nach der Präparation werden die Zellkulturen für 10 Tage bebrütet. Das Wachstum wird makroskopisch, sowie mikroskopisch überprüft. Unter dem Mikroskop wird bewertet, ob sich die Zellen soweit vermehrt haben, dass der Flaschenboden einen Zellrasen gebildet hat. Sobald die Zellen also konfluent sind, werden die Flaschen 24 Stunden bei geschlossenem Deckel, 180 rpm und 37°C gleichmäßig auf einem Schüttler geschwenkt.

Das mechanische Schütteln, sowie im Folgenden genannte Verfahren, dienen dazu Zellen wie Oligodendrozyten und Mikrogliazellen, die weniger fest am Flaschenboden anhaften, von der möglichst reinen Astrozytenkultur zu trennen.

Im Vorfeld werden 24 Wellplatten mit Deckgläsern versehen und mit PDL beschichtet (je 250µl PDL auf 25ml PBS) und mindestens über Nacht bei 4°C gelagert. Diese werden dann je drei Mal mit PBS gewaschen und dann mit Wachstumsmedium versehen, um dann im Brutschrank für die Zellen angewärmt zu werden.

Als Nächstes wird jede geschüttelte Flasche drei Mal je mit 10ml PBS gewaschen. Im Anschluss werden 5 ml vorher angewärmtes und mit 20 µm Non-pyrogenic Filtern steril filtriertes Trypsin auf die Flasche gegeben. Die Kulturflaschen sollten 4-5 min im Brutschrank bebrütet werden, werden dann leicht abgeklopft und unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen sich vom Flaschenboden gelöst haben. Nach der Kontrolle werden zügig 5ml Wachstumsmedium (mit 10% FBS) auf die Zellen gegeben, um die Reaktion zu stoppen und dann weitere 10ml hinzugegeben. Die nun insgesamt 20 ml beinhaltende Lösung wird in ein Falcon aufgenommen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Medium-Trypsin-Überstand wird abgesaugt, zu dem Zellsediment wird 1 ml Medium hinzugegeben und die Zellen werden mit vorher durch den Bunsenbrenner verengte Pipetten tituiert.

Dabei werden erst weitere, dann engere Glaspipetten verwendet und mit kreisenden Bewegungen auf- und ab pipettiert. Nun werden weitere 3 ml Wachstumsmedium zu den 1ml hinzugegeben. Es folgt das Zählen der Zellen, bei dem vom Medium-Zellgemisch 100 µl entnommen und mit 100 µl Trypanblau in ein Eppendorf-tube pipettiert werden. Vom Tube entnimmt man je 10µl und gibt diese auf beide Seiten der Thomazellkammer. Die Zellen werden nun unter dem Mikroskop gezählt und daraus wird dann errechnet, ob zu den bisherigen 4 ml des Zell-Mediumgemischs noch Medium hinzugegeben werden muss, um die richtige Zelldichte von 100 000 Zellen pro Well zu erreichen. Nach der Berechnung und

ggf. Korrektur der Zelldichte wird jedes Well der vorher vorbereiteten 24-Wellplatten mit je 100µl des Zell-Mediumgemischs beimpft. Dabei werden die Astrozyten zunächst auf serumhaltigem (10% FBS) Wachstumsmedium kultiviert.

Die beimpften Platten werden bei 10% CO₂ und 37 °C im Brutschrank gelagert. Das Medium wird das erste Mal nach 3 Tagen gewechselt, um den Zellen Zeit zu geben sich an die Coverslips zu heften und zu proliferieren. Anfangs werden die Zellen mit Wachstumsmedium beimpft. Nach ausreichender Reifung erfolgt dann die Umstellung auf Differenzierungsmedium (N2) nach dreimaligem Waschen mit PBS. In der Regel erfolgt dies 3-5 Tage nach der Passage.

3.3. DNA-Extraktion und PCR

3.3.1. RNA-Extraktion

24-Well-Platten werden drei Mal mit PBS gewaschen und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann werden sie mit je 500 µl Trizol versehen und für weitere 5 min inkubiert.

Der Inhalt der Wells wird mithilfe einer Pipette unter leichtem Kratzen mit der Pipettenspitze an den Coverslips in 24 Mikro-Schraubröhren-Tubes überführt.

Die Tubes werden im -80°C Kühlschrank gelagert.

Zur Weiterverarbeitung werden die Tubes auf Raumtemperatur angewärmt und aufgetaut.

Die leicht angetauten Zell tubes werden je ca. 15 Sekunden mit dem Zelmörser zerkleinert und auf Eis gelegt. Nun werden in jedes Tube 100 µl Chloroform gegeben, die Tubes werden gevortext, 50-mal hin- und hergeschwenkt und dann wenige Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Desweiteren werden die Tubes bei 12000 rpm und 4°C 15 Minuten zentrifugiert. Als nächstes wird der farblose Überstand abpipettiert und je in ein neues vorher vorbereitetes 1,5 ml großes Eppendorftube überführt. Dabei ist die Gesamtmenge des Überstandes ca. 200µl. Zu dem Überstand werden 1µl Glycogen und 250µl Isopropanol (= 2-Propanol) hinzugegeben. Die Eppendorf-tubes werden gut gevortext und mindestens 30 Minuten im -20 °C Kühlschrank aufbewahrt. Nach einem kurzen Auftauen der Proben werden die Tubes bei 10 000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und zu dem zurückgebliebenem Zellpellet werden pro Tube 500µl 75%iger Ethanol, bestehend aus 5ml DEPC-Wasser und 15ml 100%iger Ethanol, gegeben. Anschließend werden die Tubes wieder bei 10 000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert.

Auch hier wird der Überstand so gut wie möglich abpipettiert. Die Menge an Ethanol, die nicht entfernt werden konnte, dampft unter dem Abzug ab. Auf das nun zurück gebliebene RNA-Pellet werden 20 µl DEPC-Wasser gegeben. Die Proben werden nun für 10 min bei 56°C und 400 rpm auf den Wärmeblock gegeben, damit sich die RNA-Wasserlösung homogenisiert.

Im Anschluss daran erfolgt die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes am Nano-drop-Gerät (ND-1000v35.2). Dabei wird zunächst das Gerät mit DEPC-Wasser genullt und anschließend von jeder Probe je 1,5µl auf das Messgerät pipettiert.

3.3.2. cDNA-Herstellung

Sobald alle Proben gemessen worden sind, wird ausgerechnet, wieviel von den Proben zur Herstellung der cDNA entnommen werden muss, um bei allen Proben die gleiche RNA-Menge zu generieren. Verdünnt werden die Proben mit DEPC-Wasser. Insgesamt beträgt das Protein-Wasser-Gemisch 7,7 µl. Zu den 7,7 µl wird zu jeder Probe ein Mastermix bestehend aus 2µl RT-Puffer, 4,4 µl MgCl₂, 4µl dNTPs, 1µl Random Hexamers (RanHex), 0,4µl RNase-inhibitor und 0,5µl Reverse Transkriptase pro Ansatz hinzugegeben. Dies sind in der Summe 12,3µl Mastermix pro Probe, sodass ein Samplevolumen von insgesamt 20µl hergestellt wird.

Schließlich werden die Proben auf den PCR-Block (Gene Amp PCR System 9700) gesetzt. Dabei läuft das Programm 10 min bei 25°C, 30 min bei 48°C und 5 min bei 95°C und wird bei Vollendung auf 4°C heruntergekühlt.

Die fertig hergestellte cDNA wird mit DEPC-Wasser auf 200µl 1:20 verdünnt, sodass zu den 20 µl Probenvolumen 180µl DEPC-Wasser hinzugegeben werden.

3.3.3. PCR

PCR mit GAPDH als *housekeeping*-Gen:

Es wird ein vierfacher Reaktionsansatz hergestellt. Dabei besteht ein Reaktionsansatz aus 7µl RNase freiem Wasser (DEPC-Wasser), 2 µl des jeweiligen Primers (je 2 µl für die *forward*- und je 2 µl für die *reverse*-Sequenz) und 5,5 µl der jeweiligen auf 1:20 vorverdünnten cDNA-Lösung (*template*).

Jeder Ansatz ist für ein Triplet ausgelegt und wird deshalb bei der 96-Well-PCR-Platte auf drei Wells à 15 µl verteilt. Zu jedem Well werden 15 µl Sybr Green hinzugegeben.

Als nächstes wird eine Schutzfolie ohne Bildung von Luftblasen auf die Wellplatte gelegt.

Die PCR-Platte wird in das PCR-Gerät „7000 Sequence Detection System“ gegeben und dort wird das Programm „ABI SDS“ benutzt.

Bei der „*Absolute quantification*“ wird für die Durchführung der PCR eine „96-Well“-Platte bei einem Samplevolumen von 30 µl folgendes Programm verwendet:

2 min: 50°C

10 min: 95°C

15 Sec: 95°C

1 min: 60°C

Für die letzten beiden Schritte gelten 50 Wiederholungen. Außerdem wird ein Dissoziationsprotokoll bis 60°C angegeben.

Nach dem praktischen Teil der Experimente erfolgte die Auswertung der PCR-Daten mithilfe der Delta-Delta-CT-Methode [55, 56].

Alle CT-Werte des *housekeeping genes* Gapdh, auf welches die weiteren Primer im Rahmen der Delta-Delta-CT-Methode Bezug genommen wurden, wurden zusammengerechnet und es wurde der Mittelwert bestimmt. Dies ermöglichte es eine Normierung des Gapdhs vorzunehmen, welches somit als Referenzwert für alle weiteren Berechnungen für die Delta-Delta-CT-Rechnungen verwendet werden konnte.

CT-Werte über 35 wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da die Aussagekraft zu gering gewesen wäre. CT-Werte, die im Vergleich zu den anderen Werten zu hoch sind, lassen den Schluss zu, dass das zu ermittelnde Produkt in zu geringer bis keiner Menge vorhanden ist.

Als statistische Tests wurden der „*one Way Anova*“ und anschließend der „*Bonferroni's Multiple Comparison Test*“ verwendet.

3.4. Calciumimaging

Für die Experimente werden Astrozytenkulturen auf PDL-beschichteten Coverslips in 24-well-Zellkulturplatten verwendet, die 7 Tage lang in serumfreiem Differenzierungsmedium kultiviert wurden.

Zunächst wird eine 4-Wellplatte, die vom Volumen her einer 24-Well-platte entspricht, vorbereitet. In das erste Well wird eine 0,5 ml HEPES-Ringer-Lösung mit Glucose und 15µM Fura gegeben. Im zweiten Well befinden sich nur noch 0,5 ml HEPES-Ringer und Glucose. Nach den beschriebenen Schritten wird ein mit Astrozyten bewachsener Coverslip entnommen und abgedunkelt bei Raumtemperatur für 60 min in das erste Well zum Färben gegeben.

Als nächstes wird der Coverslip zum Waschen in das zweite Well für weitere 30 min gelegt. Nun wird das Coverslip in eine kleine Petrischale unter dem Mikroskop Nikon Eclipse FN1 abgedunkelt hinter einem Vorhang gegeben. Über ein Schlauchsystem werden die Substanzen zu dem Coverslip weitergeleitet, so dass es immer eine zeitliche Verzögerung gibt vom Moment, in dem die Substanz hinzugegeben wird und dem nächsten, wenn die Substanz tatsächlich bei dem Coverslip im Bad ist. Das Mikroskop ist zudem mit dem Computer verbunden, sodass dort die Zellaktivität gemessen und beobachtet werden kann. Zu Beginn der eigentlichen Experimente werden die Zellen mit Normalringerlösung gewaschen. Danach wird die S1P-Rezeptor-Aktivität gemessen. Die Zellen werden mit dem natürlichen S1P-Rezeptor-Liganden Sphingosin-1-Phosphat stimuliert. Anschließend werden die Reaktionsauschläge der Astrozyten gemessen sowie auf Bildern festgehalten, wie stark sich die Astrozyten bei Substanzzugabe und Einwaschung zusammenziehen.

Im Anschluss an das Einwaschen mit Sphingosin-1-Phosphat wurden noch Experimente mit den Inhibitoren W123 und U73122 durchgeführt.

W123 ist ein kompetitiver Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Antagonist des Subtypen 1, der die Ligand-Rezeptor-Aktion blockiert und wurde bereits in Kapitel 1.4.1. erläutert.

Bei U73122 handelt es sich um einen Phospholipase C-Inhibitor [57], d.h. in die über das Gq-Protein vermittelte Signalkaskade wird eingegriffen. Phospholipase C sorgt im aktivierten Zustand für die Umwandlung von PIP₂ in DAG und IP₃. Die Bildung der genannten Produkte induziert im Verlauf die Aktivierung der Proteinkinase C und die intrazelluläre Calciumausschüttung. In Folge daraus können keine weiteren Signale über die Proteinkinase C übermittelt und keine weitere Kommunikation über die Calciumausschüttung erzeugt werden. Die beschriebenen Effekte des U73122, welche auch für die Calciumimaging Experimente relevant sind, verdeutlichen das Eingreifen in den Calciumstoffwechsel auf enzymaler Ebene. Weitere Funktionen und Wirkmechanismen des U73122 sind noch nicht bekannt, doch es wurde u.a. eine direkte hemmende Wirkung auf TRH in Rattenhypophysen [58] erforscht.

Die hier beschriebene Methode des Calcium-imagings wird verwendet, um den Anstieg der Calciumkonzentration jeweils in einer Zelle zu messen. Dabei werden in der Regel Indo-1 und Fura-2 als photometrische Färbemittel oder Fura-4 als Färbemittel im Ein-Wellenlängenverfahren benutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Fura-2 als Calciumindikator gebraucht [59].

Da Fura-2 selbst wegen seiner Carboxylgruppen polar ist und deshalb die Membran nicht passieren kann, werden die Zellen in einer Fura-2/AM-Lösung inkubiert. Die AM-Form bezeichnet eine Veresterung, bei der an den Carboxylgruppen Acetoxymethylreste binden, welche unpolar sind und das ganze Molekül somit die Membran überwinden kann. Sobald dies geschehen ist, werden die Acetoxymethylreste durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, sodass der Calciumindikator frei wird und nun wirken kann [59].

Fura-2 bewirkt intrazellulär, dass die Zellen dunkel angezeigt werden, wenn Calcium an dieses gebunden hat, da sich das Wellenlängenspektrum ändert, nachdem die Bindung stattgefunden hat [59]. Der Schritt des „Dunkel-Werdens“ wird in einem Graphen als Calciumanstieg angezeigt. Nachdem im Bad die nötige Konzentration der Substanz erreicht worden ist, werden im angezeigten Bild die Zellen nacheinander dunkel. Sobald wieder Ringerlösung eingewaschen wird, dauert es einige Zeit, bis die Zellen sich wieder „erholen“ und heller werden, da das polare Fura-2 die Zelle nicht wieder verlassen kann, sondern verstoffwechselt werden muss.

Es wurden folgende Konzentrationen für die Experimente gewählt: 50 nM S1P, 5/ 10 μ M U73122 und 1 μ M/ 2 μ M W123.

Die Durchführung der Calciumimaging-Experimente erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Neurobiologie der Uni Düsseldorf unter der Leitung von Frau Prof. Rose und Frau Roderigo.

4. Ergebnisse

4.1. PCR

4.1.1. S1P-Rezeptorverteilungsmuster

Um eine gezielte Aussage darüber treffen zu können, auf welche Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren Fingolimod in den repräsentativ kultivierten Astrozyten wirkt, wurden zunächst unbehandelte Kontrollzellen aus besagten Kulturen verwendet.

Insgesamt wurden hierbei 8 unterschiedliche Kontrollen untersucht (siehe Abbildung 5).

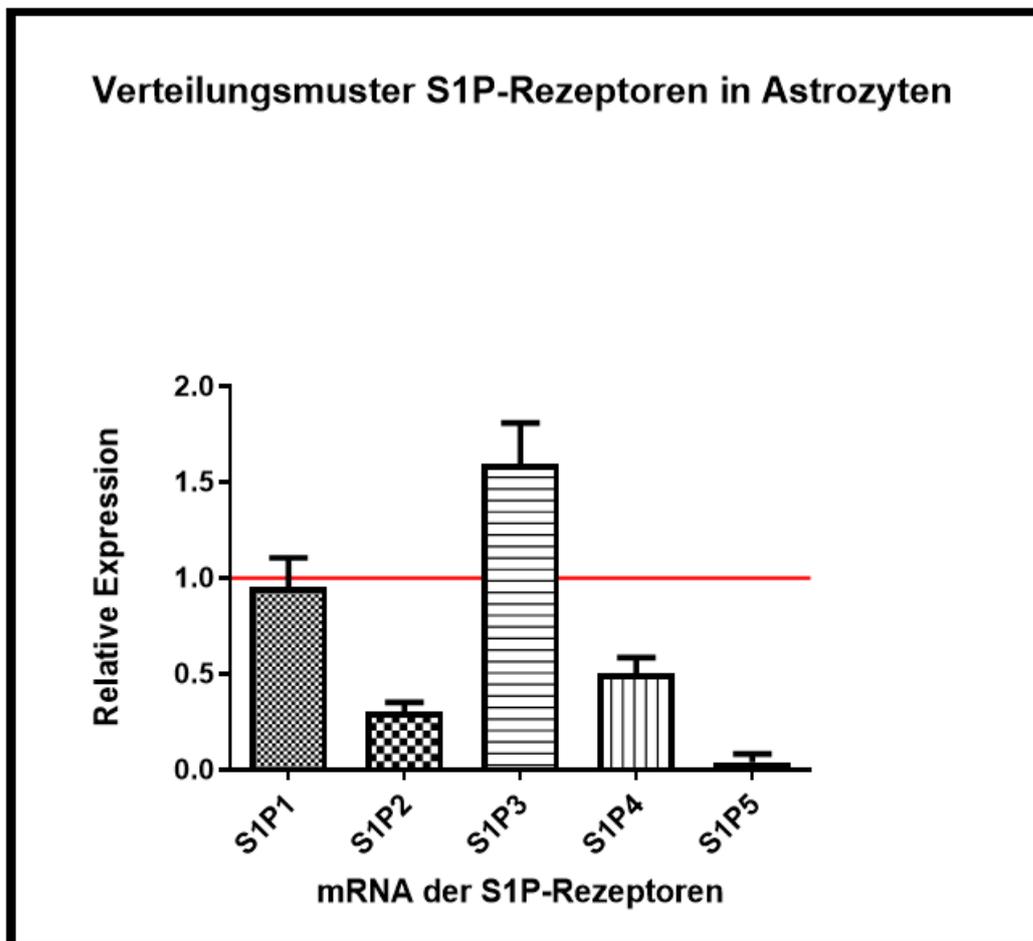


Abb. 5: Verteilungsmuster der S1P-Rezeptoren (mRNA) bei unbehandelten Astrozyten

Am häufigsten ließen sich die mRNA der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoruntertypen 3, gefolgt von 1 nachweisen. S1P2 und S1P4 waren geringer ausgeprägt, S1P5 wurde nicht berücksichtigt, da die CT-Werte entweder zu hoch oder nicht ermittelbar waren.

Bezüglich der S1P5-Rezeptoren konnten 24 Mittelwerte in der Delta-Delta-CT-Methode, nicht errechnet werden, da sie zuvor in den CT-Werten nicht bestimmt werden konnten.

Der CT-Mittelwert (von den CT-Werten, die überhaupt detektierbar waren) zur Ermittlung der S1P5-Rezeptorexpression betrug „38,26“ und war somit zu hoch, um von einem validen Ergebnis zu sprechen.

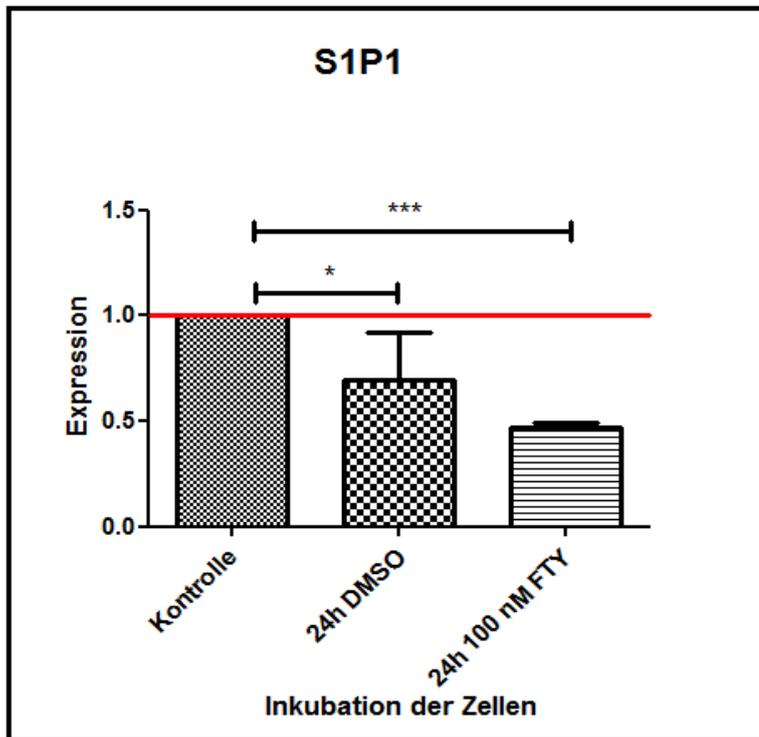
4.1.2. S1P1-Rezeptorexpression im Vergleich

Nachdem zuvor bestätigt wurde, dass in den Astrozytenkulturen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren des Typs 1 vorhanden sind, galt es zu überprüfen, ob Fingolimod diese auch inhibiert. Dazu wurden Astrozytenplatten für 24 Stunden mit Fingolimod (100nM) und dementsprechenden DMSO-Kontrollen, da Fingolimod in DMSO gelöst wurde, inkubiert.

Im Anschluss daran wurden PCRs mit den Primern für die S1P1- und S1P3-Rezeptoren durchgeführt. Die Analysen der S1P1-Rezeptorexpression mit und ohne vorherige Medikamenteninkubation sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

Insgesamt sind dort 4 Experimente mit identischem Versuchsaufbau zusammengefasst.

Als Referenzwert in der Delta-Delta-CT-Methode zur Auswertung der PCRs wurden die CT-Werte der Kontrolle verwendet, sodass deren gemittelte relative Expression im Diagramm bei „1“ liegt.



Anzahl der * korreliert mit dem Grad der Signifikanz

Abb. 6: Vergleich der S1P1-Rezeptoren nach Inkubation mit DMSO und Fingolimod

Nach einer vorherigen Inkubation der Astrozyten mit 100 nM Fingolimod sinkt mRNA-Menge der Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptoren im Vergleich von der Kontrolle und der DMSO-Inkubation.

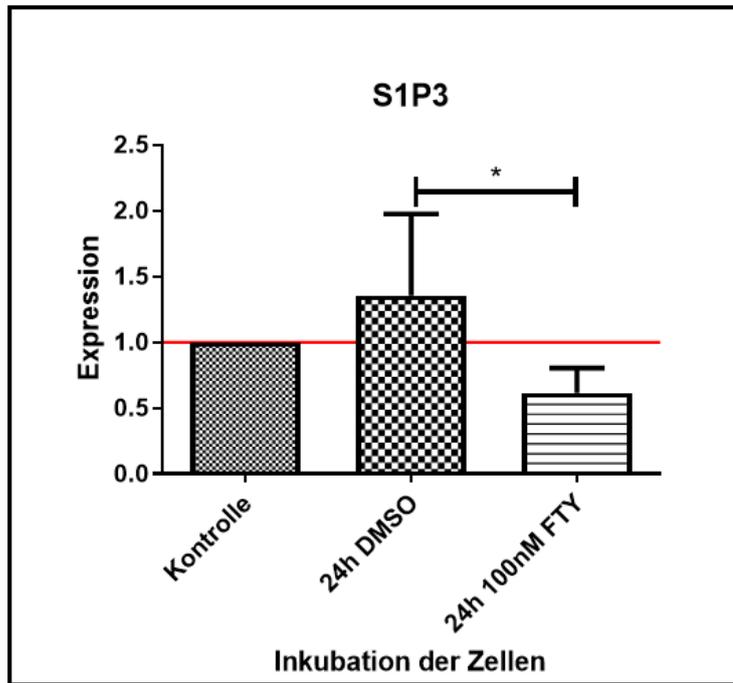
Die Signifikanz zwischen der Kontrolle und der mit Fingolimod vorinkubierten Zellen ist hierbei deutlich stärker als im direkten Vergleich von DMSO und Fingolimod, bei welchem keine Signifikanz ermittelt werden konnte.

Anhand des Fehlerbalkens in der DMSO-Säule ist jedoch zu erkennen, dass eine stärkere Streuung der Daten zu geben scheint.

4.1.3. S1P3-Rezeptorexpression im Vergleich

Bei der S1P3-Expression konnte ein ähnliches Ergebnis erzielt werden (siehe dazu auch Abbildung 7). Nach 24 Stunden Inkubation mit Fingolimod zeigte sich eine Reduktion der S1P3-Rezeptoren im Gegensatz zu den Kontrollen. Allerdings zeichnete sich in den DMSO-Kontrollen eine leichte Erhöhung der Rezeptoren ab. Für den Vergleich der Werte der Inkubation mit DMSO mit den Werten nach Inkubation mit Fingolimod konnte eine

geringere Signifikanz errechnet werden. Für die anderen Werte konnte keine Signifikanz festgestellt werden.



*Anzahl der * korreliert mit dem Grad der Signifikanz*

Abb. 7: Vergleich der S1P3-Rezeptoren nach Inkubation mit DMSO und Fingolimod

Insgesamt ist auch in dieser Experimentenreihe eine Inhibition der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren des Untertyps 3 zu erkennen.

4.2. Calciumimaging

Nachdem die PCR-Ergebnisse einen guten Überblick über die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in den angelegten Astrozytenkulturen geschaffen haben und wie Fingolimod auf diese wirkt, sollten die Calciumimagingexperimente zeigen, wie noch „lebende“ Astrozytenkulturen auf äußere Einflüsse reagieren. Die Calciumantwort der Astrozyten gibt hierbei Aufschluss darüber, ob eine Erregung der Zellen stattgefunden hat.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde die Zeit gemessen, bis die Substanz, welche untersucht werden sollte, über das Schlauchsystem in das Bad, d.h. dem Zielort, wo sie wirken soll, gelangt. Diese Zeit wurde als „Loop“ bezeichnet. Zusätzlich wurde die Zeit gemessen, nach der eine Reaktion stattgefunden hat. In manchen Fällen war die

Reaktionszeit die gleiche, wie die, in der die Substanz in die Zellen gelangt ist, und erfolgte somit direkt.

In anderen Fällen dauerte es nach dem Eindringen der Lösung einige Zeit, bis eine Reaktion der Astrozyten messbar war.

Im Folgenden werden alle Substanzen in ihren jeweiligen Konzentrationen erwähnt, welche den Astrozytenkulturen hinzugegeben wurden.

In den dargestellten Graphen ist die Calciumausschüttung als Wellenlängendifferenz in Abhängigkeit von der Zeit in Minuten aufgetragen. Die in unterschiedlichen Farben gekennzeichneten Linien stehen für die unterschiedlichen „Rois“. Die sogenannte „Region of interest“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass im Mikroskop einzelne Regionen im Sinne von reagierenden Zellen beobachtet und festgelegt worden sind, um ihre Entwicklung zu dokumentieren.

4.2.1. S1P

Zunächst wurde in den Experimenten überprüft, ob die Astrozytenkulturen ein Calciumsignal nach Hinzugabe des natürlichen Liganden der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren, also des Sphingosin-1-Phosphats, generieren konnten.

Dies ist von essentieller Bedeutung, da somit die Vitalität der Zellen und eine Aussage über die Expression der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren im Sinne einer Vergleichbarkeit getroffen werden kann, bevor weitere modulierende Experimente im Anschluss durchgeführt werden.

Nach Einwaschen mit Ringerlösung wurden Astrozytenplatten mit Sphingosin-1-Phosphat in einer Konzentration von 50 nM für 1 min eingewaschen. Dabei gibt es Experimente, in denen nur Erstinkubationen mit Sphingosin-1-Phosphat erfolgt sind und die danach mit anderen Substanzen fortgesetzt wurden. In anderen Experimenten erfolgten mehrere Inkubationen mit Sphingosin-1-Phosphat hintereinander.

In den Experimenten, in denen es nur eine Erstinkubation gegeben hatte, war die Substanz im Mittel bei ca. 149, 92 Loops im Bad. Nach ca. 161, 36 Loops war eine Reaktion messbar. Nach einer Zweitinkubation mit Sphingosin-1-Phosphat dauerte es hingegen 449, 43 Loops bis die Substanz im Bad war und 461, 43 Loops bis die Zellen ein Signal erzeugen konnten. In den Experimenten, in denen drei Inkubationen mit Sphingosin-1-Phosphat hintereinander stattgefunden hatten, war die Substanz erst nach 759,33 Loops im Bad mit einer erfolgten

Reaktion nach ca. 771, 33 Loops. Bei Betrachtung der Differenzen zwischen dem Zeitpunkt, bis die Substanz im Bad war und bis eine tatsächliche Reaktion stattgefunden hat, liegen diese bei „11,44“, „12“ und nochmals „12“ und sind somit nahezu identisch.

Dies bedeutet, dass eine mehrmalige Inkubation mit Sphingosin-1-Phosphat zwar mit einem höheren Loop einhergeht, allerdings die Reaktionszeit konstant bleibt.

4.2.2. S1P und W123

In den PCR-Ergebnissen wurde bereits das Expressionsmuster der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in fixierten Zellen untersucht. Beim Calciumimaging wurde dieses auch bei „lebenden“ Zellen untersucht, da im weiteren Verlauf auch eine Hemmung durch Fingolimod untersucht wurde. Zunächst wurde gezielt mit W123 ein selektiver reversibler Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptorantagonist verwendet (siehe Abbildung 8).

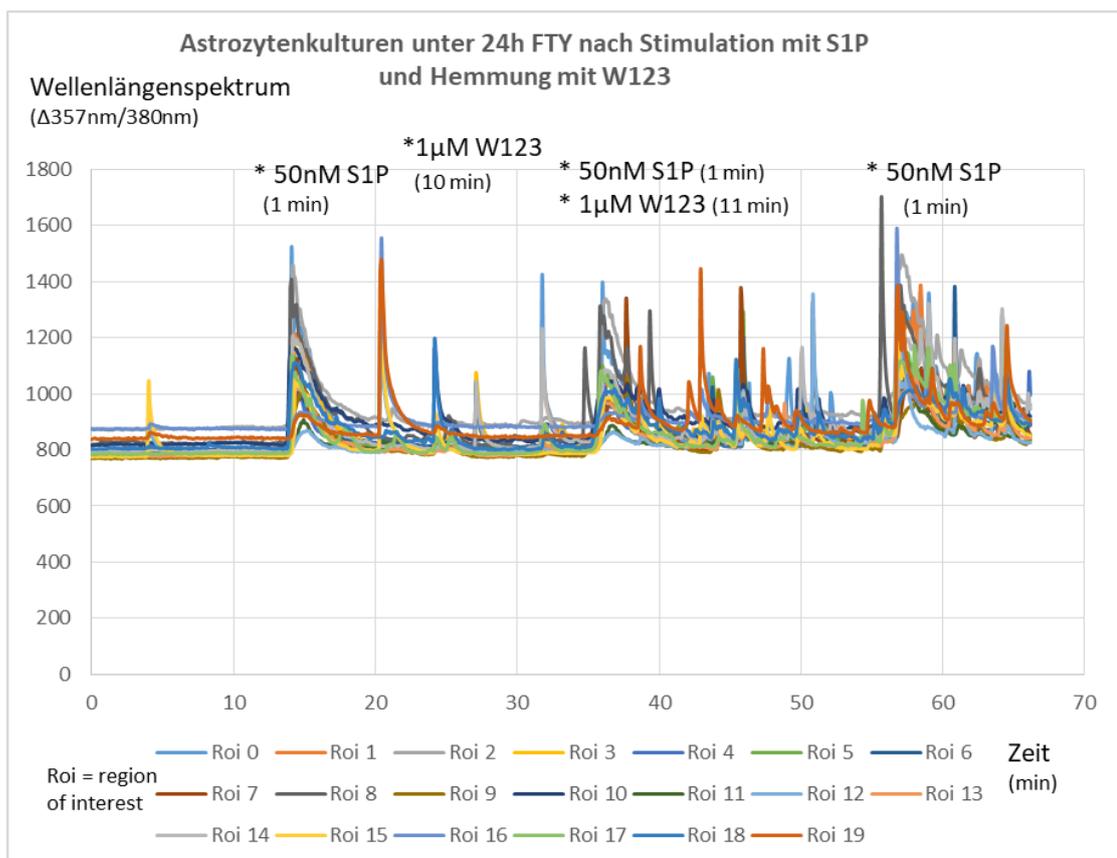


Abb. 8: S1P-Signal der Astrozyten vor und nach Inhibition mit W123

Nachdem in den ersten 10 Minuten mit Normalringerlösung eingewaschen worden war, wurden die Zellen 1 Minute mit 50 nM Sphingosin-1-Phosphat inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation des natürlichen Liganden ab ca. Minute 12 konnte ein steiler Anstieg des Calciumsignals von einem Bereich von 800 bis knapp unter 900 auf ca. 1500 vermerkt werden. Danach sank die Kurve direkt ab Minute 12/13 und erzielte ab ca. Minute 19 das Grundsignal, welches bei 800 bis 900 liegt. In den darauffolgenden Minuten wurden aus den schon vorerregten Astrozyten in einigen „Rois“ vereinzelte Erregungen gemessen, die allerdings nicht mit der Grundreaktion der gesamten Astrozyten korrelierten.

Da die Funktionalität der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren überprüft wurde, konnte nun ab ca. Minute 25 für ca. 20 Minuten mit 1 μ M des Inhibitoren W123 eingewaschen werden. Danach konnte bis auf vereinzelte Signale keine Calciumantwort generiert werden.

Danach wurde mit dem genannten Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptor-Antagonisten, sowie dem natürlichen Liganden Sphingosin-1-Phosphat eingewaschen.

Der Großteil der Astrozyten zeigte direkt ab Minute 36 einen steiler Anstieg der Calciumantwort mit einem Maximum knapp unter 1400 und mit einem Abfallen auf das Grundsignal bei ungefähr 40 Minuten, wobei einige „Rois“ etwas zeitversetzt ihre Antwort ungefähr bei 1300 hatten und erst nach Minute 50 verstummten. Ab Minute 55 wurde wieder für 1 Minute mit 50 nM Sphingosin-1-Phosphat stimuliert. Die Auswirkung war ähnlich der in der Ausgangssituation, in der ein schlagartiger Calciumanstieg bis ca. 1500 in den meisten „Regions of interest“ erfolgte. Diesmal dauerte es allerdings länger, bis alle Zellen ihr Signal wieder auf 800 bis 900 senkten.

Die Astrozytenkulturen zeigen nach W123-Inkubation ein schwächeres Calciumsignal, welches allerdings nicht ganz zum Erliegen kommt. Da W123 ein selektiver Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptor-Antagonist ist, bedeutet dies, dass die Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptoren inhibiert werden und das restliche Signal von anderen Rezeptorenuntertypen gebildet werden muss. Außerdem war die Calciumantwort der Astrozyten nach Auswaschen des W123 wieder annähernd dem Signal gleich, bevor W123 überhaupt eingewaschen worden ist. Dies zeigt, dass der inhibierende Effekt von W123 reversibel ist.

4.2.3. S1P und U73122

Im vorangegangenen Kapitel konnte mittels des selektiven Sphingosin-1-Rezeptor-1-Inhibitors gezeigt werden, dass Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptoren in den zu untersuchenden Astrozytenkulturen exprimiert werden. Trotz der Inhibition mit W123 konnte ein weiteres Calciumsignal gemessen werden, welches bei einer Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat für eine Expression anderer Rezeptoruntertypen spricht.

Zur weiteren Nachforschung wurden Experimente mit dem irreversiblen Phospholipase C-Inhibitor U73122 durchgeführt (siehe Abbildung 9).

Nach Minute 9 wurde mit 50 nM Sphingosin-1-Phosphat stimuliert, welches ein Calciumsignal mit einem Maximalwert von ungefähr 1400 zur Folge hatte. Bei Minute 15 stellte sich das Grundsignal zwischen 800 und 900 wieder ein, welches überwiegend konstant blieb. Ab ca. Minute 30 startete das Einwaschen mit 5 μ M U73122 für ca. 15-20 Minuten. Als dann nach Minute 42 für 1 Minute mit 50 nM Sphingosin-1-Phosphat stimuliert wurde, war keine relevante Calciumantwort zu vermerken. Im Gegensatz zur selektiven Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptor-Hemmung über W123 war die Inhibition in diesem Experiment vollständig, da es keinerlei Calciumausschüttung zu verzeichnen gab. Phospholipase C spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃), welche einen intrazellulären Calciumanstieg bewirken, der in diesem Versuch ausbleibt. Dies bedeutet, dass die verwendeten Astrozytenkulturen Rezeptoren aufweisen, die Gq-proteinvermittelt funktionieren.

Von den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren wirken Rezeptoren des Untertyps 3 über die Gq-Protein-Kaskade.

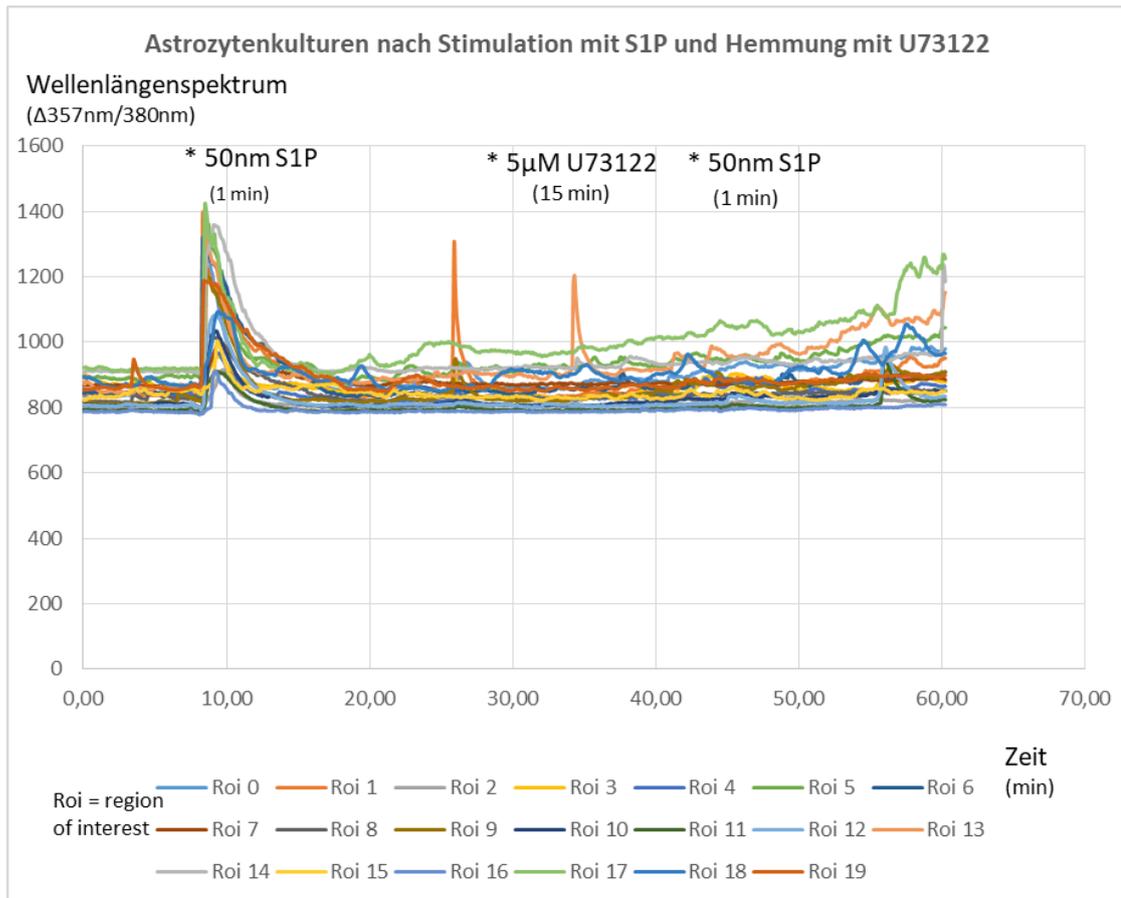


Abb. 9: Inhibition unbehandelter Astrozyten mit U73122

4.2.4. S1P und Fingolimod

Nach eingehender Prüfung der Astrozytenkulturen hinsichtlich der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Expression folgen nun die Ergebnisse nach Inkubation mit Fingolimod als Sphingosin-1-Phosphat-Modulator.

Für diese Versuchsreihe wurden 24 Stunden vorinkubierte Astrozyten mit 100 nM Fingolimod mit ihren jeweiligen DMSO-Kontrollen verwendet.

Die mit der DMSO-Kontrolle vorinkubierten Astrozyten zeigen nach Einwaschen mit Ringerlösung ab Minute 11 mit 50 nM S1P eine adäquate Stimulation.

In Abbildung 10 ist ein steiler Calciumausschlag von ca. 1300 zu messen. Der Peak lag bei 11 Minuten und das Signal fiel danach wieder bis zum initial gemessenen Signal ab mit einem Wert von ca. 800-900 und zwei Signalen von zwei Rois bei ca. 1000 bei Minute 16. Ab Minute 31 wurde mit 1 nM Glutamat stimuliert und eine Calciumantwort mit einem Maximum von 1600 bei Minute 31/32 erwirkt. Nach Absinken des Signals wurde in diesem

Experiment wieder das Ursprungssignal bei 800-900 mit verbleibenden einzelnen Signalausschlägen von immer noch erregten Zellen zurückerlangt.

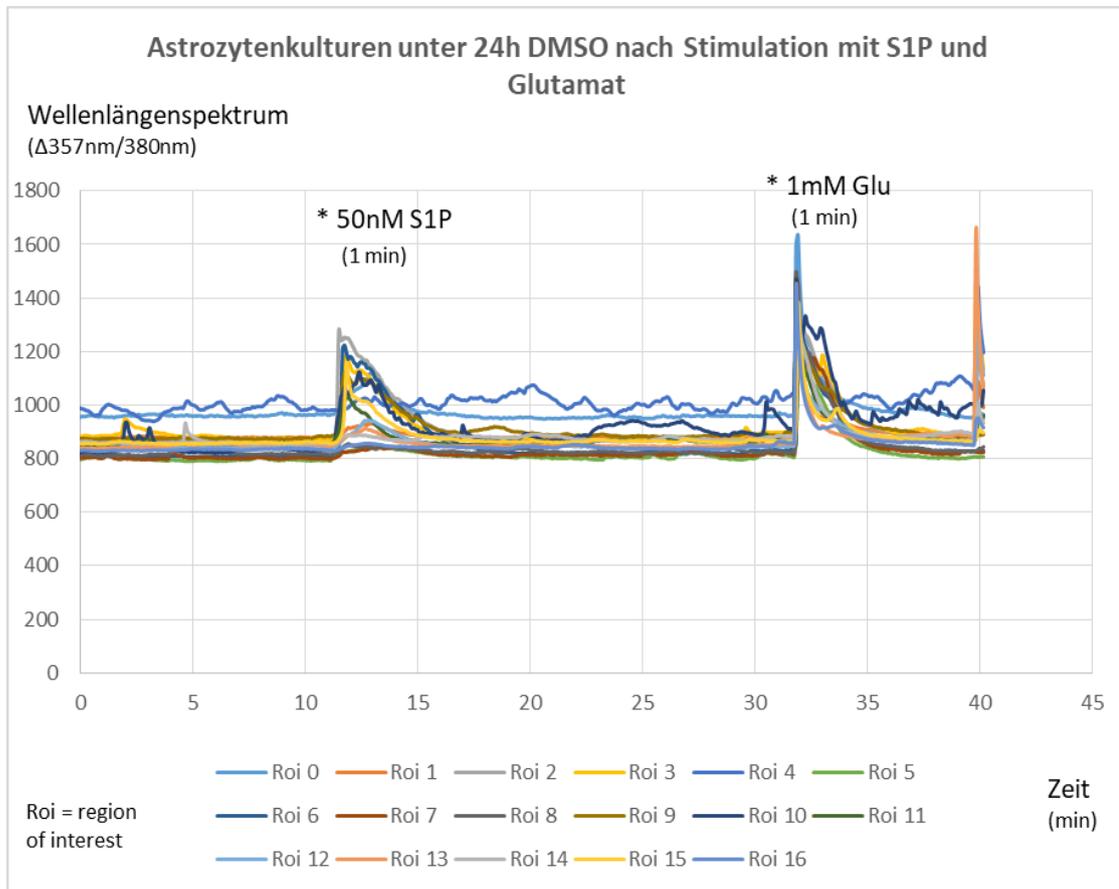


Abb. 10: **Stimulation von DMSO vorinkubierten Astrozyten mit S1P und Glutamat**

In den mit DMSO vorinkubierten Astrozytenkulturen konnte daher eine weiterhin ungehinderte Calciumausschüttung nach Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat und Glutamat gezeigt werden.

Im Anschluss daran wurden mit Fingolimod vorinkubierte Astrozyten dem gleichen Versuchsaufbau unterzogen.

Zu Beginn wurde 10 Minuten mit Normalringerlösung eingewaschen. Kurz nach Minute 10 erfolgte dann die Stimulation mit 50 nM Sphingosin-1-Phosphat für 1 Minute.

In Abbildung 11 sind bis auf einzelne kleinere Ausschläge bis max. 1000 kein Calciumsignal, sondern eine konstante Ursprungslinie bei ca. 800-900 zu sehen. Ungefähr bei Minute 31 wurde diesmal mit 1 mM Glutamat stimuliert.

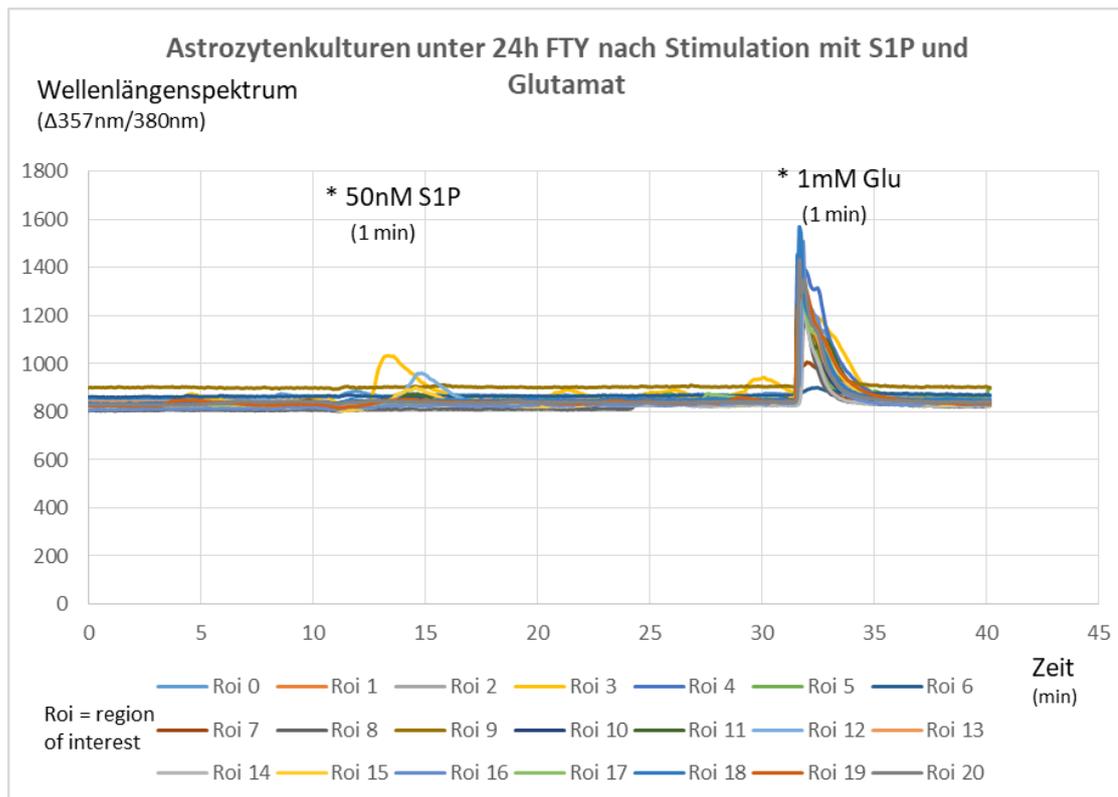


Abb. 11: Stimulation von Fingolimod vorinkubierten Astrozyten mit S1P und Glutamat

Daraufhin erscheint ein Anstieg auf ca. 1600 mit seinem Kurvenmaximum bei Minute 31 und einem steilen Abstieg direkt nach Minute 31, bis sich ungefähr bei Minute 34 der Graph wieder bei seinem ursprünglichen Wert 800-900 befindet.

Dieses Experiment zeigt, dass Fingolimod verhindern konnte, dass Sphingosin-1-Phosphat an seinen natürlichen Rezeptor binden und eine Calciumausschüttung mit messbarem Calciumsignal auslösen konnte. Nun könnte der Eindruck erweckt werden, dass die mit Fingolimod vorinkubierten Zellen durch die lange Inkubationszeit und dadurch, dass ihnen ein Fremdstoff zugefügt worden ist, in den Zelltod gegangen sein könnten. Um dennoch beweisen zu können, dass die Astrozyten ein Calciumsignal auslösen und eine reversible Hemmung vorliegt, wurde am Ende des Experimentes Glutamat hinzugeben, welches eine Calciumausschüttung zur Folge hatte.

Bei Berücksichtigung aller Experimente in der PCR und dem Calciumimaging konnte in den Astrozytenkulturen festgestellt werden, dass vorwiegend S1P3-Rezeptoren, gefolgt von S1P1-Rezeptoren ausgebildet werden. Die unvollständige Inhibition der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren unter dem selektiven S1P1-Antagonisten W123 trotz Stimulation mit S1P, sowie die irreversible Hemmung über U73122 als Phospholipase C-Inhibitor,

bestätigen die S1P3-Rezeptoren in den vorliegenden Astrozytenkulturen. Sphingosin-1-Phosphat-3-Rezeptoren wirken Gq-Protein-vermittelt über Phospholipase C.

Fingolimod scheint folglich Sphingosin-1-Phosphat-3-Rezeptoren zusätzlich durch Beeinflussung der Gq-Protein-gekoppelten Phospholipase C-Kaskade zu hemmen und daher als funktioneller Phospholipase C-Inhibitor zu wirken.

Da metabotrope Glutamatrezeptoren auch G-Protein-vermittelt funktionieren, wurden im Calciumimaging-Experiment mit Fingolimod vorinkubierten Astrozyten mit Glutamat stimuliert. Die darauf erfolgte Calciumausschüttung konnte beweisen, dass trotz Inhibition der Gq-Kaskade die metabotropen Glutamat-Rezeptoren nicht betroffen waren, sondern lediglich die S1P3-Rezeptoren.

5. Diskussion

Diese Arbeit sollte ein besseres Verständnis über die Wirkung von Fingolimod auf Astrozyten schaffen, mit dem Ziel seinen potentiell neuroprotektiven Effekt zu erfassen.

Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, sollte zunächst die Bedeutung von Astrozyten bezüglich der Pathogenese der Multiplen Sklerose herausgestellt werden.

Ganz ist sie bisher nicht geklärt, allerdings zeichnet sich ein auf den ersten Blick widersprüchliches Bild ab, da Astrozyten selbst multiple neuroprotektive Eigenschaften besitzen, doch in einigen Publikationen selbst die Neurodegeneration bei Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose fördern sollen. Ein Teil ihrer neuroprotektiven Eigenschaften zeichnet sich dadurch aus, dass sie Zytokine ausschütten, um immunkompetente Zellen zu rekrutieren und damit die Eindämmung von Entzündungen ermöglichen. [12] Sie nehmen Glutamat und Ammoniak auf, welche über die Blut-Hirn-Schranke gelangen, um Neurone vor Übererregbarkeit und Neurodegeneration zu schützen und wandeln Glutamat in Glutamin um [12]. Da sie selbst an der Bildung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, bilden sie ein entscheidendes Bindeglied zwischen der Peripherie und dem zentralen Nervensystem [60].

Der entscheidende Faktor hierbei ist, dass o.g. Eigenschaften in einem überwiegend „neutralen“, sich im Gleichgewicht befindlichen Milieu ausgeübt werden.

Bei einer bestehenden Neuroinflammation hingegen, welche bei der Multiplen Sklerose existiert, ist in der Literatur eine Überstimulation der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren 1 und 3 bei Astrozyten festgestellt worden [19]. Diese führt zu vermehrter Zellproliferation von Astrozyten, die eine sogenannte Gliose bilden und so funktionsfähiges Gewebe in Narbengewebe umwandeln, daher auch selbst zu einer Neurodegeneration führen können [3]. Weitere beschriebene durch Astrozyten verursachte Schädigungen von Neuronen sollen durch eine Steigerung der NO-Produktion in Astrozyten erfolgen, die durch S1P, IL-1 und IL-7 getriggert werden sollen [56]. In anderen Publikationen [60, 61] wird überdies eine Subpopulation von Astrozyten diskutiert, welche als „A1-Astrozyten“ oder „neurotoxische Astrozyten“ beschrieben werden, die sowohl Neurone, als auch die das Myelin bildenden Oligodendrozyten schädigen. Die neurotoxischen Astrozyten sollen über aktivierte Mikrogliazellen, welche $IL-1\alpha$, $TNF\alpha$, und die Komplementfaktoreinheit C1q ausschütten, gebildet werden [60, 61]. Die Funktionsweise der Astrozyten hängt folglich von den Umweltfaktoren ab. In der Literatur wird diese These bestätigt, dass in einem

homöostatischen Milieu, sowie unter lediglich kleineren Schädigungen Astrozyten weiterhin ihre regulierenden, neuroprotektiven Funktionen ausüben können, doch unter stärkerer Inflammation oder anderer Schädigung des umliegenden Gewebes „reaktiv“ werden und somit selbst Teil der voranschreitenden Destruktion sind [62]

Eine geeignete Darstellung, inwiefern Astrozyten sich sowohl morphologisch als auch in ihrer Funktionsweise abhängig von unterschiedlichen Schädigungen verändern können, findet sich in Abbildung 12.

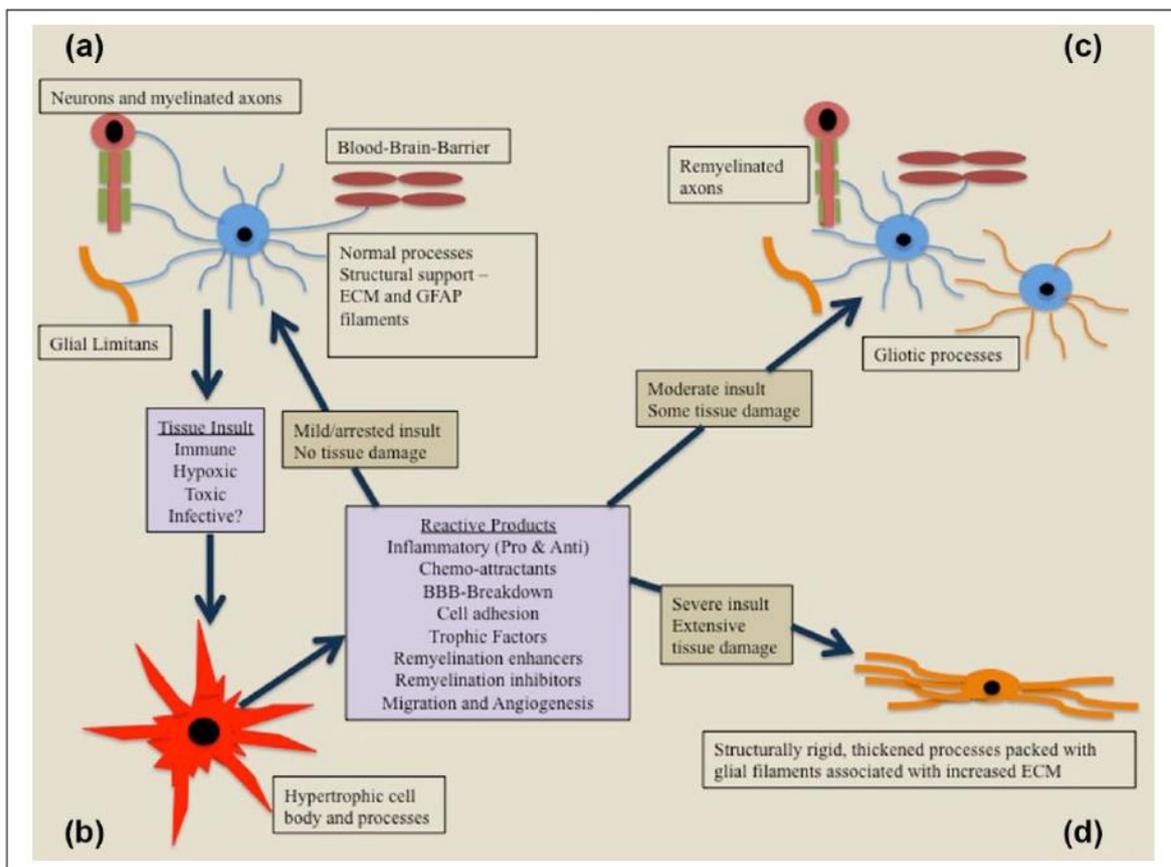


Abb. 12: Übersicht Astrozyten unter verschiedenen Umweltbedingungen [62]

Zur Evaluation, welchen äußeren Einflüssen unsere Astrozytenkulturen ausgesetzt waren, muss zunächst der Herstellungs- und Reifeprozess der Kulturen hinterfragt werden.

Da neonatale Wistar-Ratten für die Zellkulturen verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass primär undifferenzierte und proliferativ aktive Astrozyten vorherrschten.

In den ersten Tagen wurde Wachstumsmedium hinzugegeben, welches nach wenigen Tagen bereits durch Differenzierungsmedium mit einer anderen Zusammensetzung ersetzt wurde, um in kurzer Zeit eine künstliche Ausbildung der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren herbei

zu führen. Die Reifezeit der Astrozyten wurde dadurch limitiert, dass mit steigender Anzahl der Tage, in denen die Zellen mit Differenzierungsmedium versorgt wurden, die Qualität der Zellen abnahm. In der Anzucht der Astrozyten, welche dann für die Experimente verwendet wurden, musste demnach ein Kompromiss zwischen Reifegrad und Qualität der Zellen gefunden werden, um nachvollziehbare Ergebnisse zu erzielen.

Die Astrozytenkulturen wurden in dieser Arbeit unbehandelt und jeweils mit DMSO und in DMSO gelöstes Fingolimod vorinkubiert verwendet.

In den PCR-Experimenten musste eingangs eine Prüfung des Expressionsmusters der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren vorgenommen werden, um hinterher besser einschätzen zu können, welche Subtypen in den Experimenten reagieren konnten.

Es wurden 8 voneinander unabhängige Experimente, welche den gleichen Versuchsaufbau hatten, durchgeführt. Als Primer wurden außerdem alle bisher bekannten Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptorsubtypen verwendet.

Die stärkste Ausprägung zeigten die Subtypen 3 und 1, ganz vereinzelt wurden auch die Sphingosin-1-Phosphat-2- und Sphingosin-1-Phosphat-4-Rezeptoren ermittelt.

Sphingosin-1-Phosphat-5-Rezeptoren waren nicht nachweisbar, da ihr CT-Wert nicht ermittelt oder zu hoch war.

Zum besseren Verständnis ist es sinnvoll sich die Bedeutung des CT-Wertes in der quantitativen PCR-Methode zu vergegenwärtigen.

Der CT-Wert, auch als „*cycle threshold value*“ bekannt, bezeichnet den Zyklus während der PCR, in dem zum ersten Mal ein signifikantes Fluoreszenzsignal erzeugt werden konnte [63].

Je mehr Zyklen benötigt werden, um dieses Signal zu erzeugen, desto länger dauert es im Umkehrschluss bis der Primer das zu untersuchende Genprodukt findet und an dieses binden kann. Dies wiederum impliziert eine so geringe Menge des Genprodukts, die eine höhere Zyklenzahl erfordert. Auf die S1P5-Rezeptoren bezogen, welche in den verwendeten Astrozytenkulturen untersucht wurden, bedeutet ein sehr hoher bis nicht messbarer CT-Wert eine sehr geringe bis keine Menge an vorhandener mRNA.

Folglich scheint sich daraus resultierend die Expression der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in unseren Astrozytenkulturen größtenteils mit dem in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster zu decken, in welchem überwiegend die Subtypen 3 und 1, gefolgt von vereinzelt 2 ausgebildet werden. Selten soll auch der Subtyp 5 exprimiert werden, allerdings ist er bei Oligodendrozyten prominenter vorzufinden [21].

Für die Calciumimaging-Experimente wurden im Gegensatz zu der PCR „lebende“ Astrozyten verwendet. Astrozyten wurden in „ROIs“, also „Regions of interest“ unterteilt und es wurde das Signal dieser vorher ausgewählten Zellen gemessen.

Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 wurde das Calciumsignal gemessen, in dem Fura-2 mit Calciumkomplexe bildet und das Wellenlängenspektrum so verändert, dass eine Steigerung der Calciumkonzentration und somit eine vermehrte Bildung von Fura-2-Calciumkomplexen zu einem verdunkelten Signal auf dem mit dem Mikroskop verbundenem Computer anzeigt [41, 59]. Gleichzeitig wurde das Signal im Sinne von Reaktionszeiten und Kurven dargestellt.

Der Vorteil des Calciumimaging besteht darin direkt eine Reaktion der Astrozyten ermitteln zu können, nachdem eine Substanz hinzugegeben wurde, da die Aktivität der Astrozyten überwiegend von einer Calciumantwort abgeleitet werden kann [41].

Nachteilig zeigt sich, dass lebende Zellen fragiler sind, als wenn sie bereits fixiert sind und daher anfälliger für Schwankungen im Versuchsaufbau sind.

Es durfte daher nicht zu lange mit Ringerlösung eingewaschen werden, da die Zellen sonst zu reaktiv werden und weitere Inkubationen mit den zu untersuchenden Substanzen zu verfälschten Ergebnissen führen können. Trotzdem musste ausreichend ein- und ausgewaschen werden, um Kontaminationen mit den zuvor untersuchten Substanzen mit den nächsten Substanzen, welche den Zellen hinzugegeben wurden, zu verhindern, so dass die Reaktionen der Astrozyten einer Substanz eindeutig zugeordnet werden können.

Zur Aufrechterhaltung der Güte der Kulturen, wurden die Zellen stets mit Sphingosin-1-Phosphat oder Glutamat stimuliert. Bei erfolgter Antwort über Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und metabotropen Glutamatrezeptoren konnte somit während den Versuchen gewährleistet werden, dass die Astrozyten noch aktiv sind und daher die weiteren Auswertungen brauchbar sind.

Hierbei wurde auch in lebenden Zellen die Funktionsweise der Astrozyten überprüft.

Wie auch in den PCR-Ergebnissen wurde untersucht, welche Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptorsubtypen exprimiert werden, auch wenn es beim Calciumimaging nicht so präzise vorgenommen werden kann, wie bei der PCR, in der es für jeden Subtyp einen spezifischen Primer gibt. Nichtsdestotrotz konnten die S1P1-Rezeptoren über den selektiven S1P1-Rezeptorantagonisten W123 reversibel gehemmt werden. Dies konnte demonstrieren, dass der Subtyp 1 in den Astrozytenkulturen ausgebildet wird. Zusätzlich konnte während der noch bestehenden Inhibition mit W123 eine erneute Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat zeigen, dass es noch weitere Subtypen in den Kulturen gibt.

Desweiteren wurde U73122 als irreversibler Phospholipase C-Inhibitor verwendet, um gezielt Gq-Proteingekoppelte Mechanismen anzuvisieren. Nach eindrücklicher Inhibition konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Astrozyten über Gq-Protein vermittelte Rezeptoren wirken. Nach erneuter Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat konnte durch weiter bestehende Inhibition kein weiteres Calciumsignal gemessen werden.

In den PCR-Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der überwiegende Teil der in unseren Astrozytenkulturen detektierten Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren der Subtyp 3 ist.

Dies legt den Schluss nahe, dass diese irreversible Hemmung ein Signal über Gq-Proteinvermittelte Sphingosin-1-Phosphat-3-Rezeptoren verhindern konnte.

Da metabotrope Glutamat-Rezeptoren auch über das Gq-Protein funktionieren können und in anderen Versuchen die Astrozytenkulturen nach Zugabe von Glutamat eine Calciumausschüttung gezeigt haben, würden diese sicherlich auch irreversibel durch das U73122 inhibiert. Eine erneute Stimulation mit Glutamat wäre im Anschluss nicht sinnvoll gewesen, da es sich bei U73122 um einen irreversiblen Inhibitor handelt.

Um nun die Wirkung des Fingolimods auf die ermittelten Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren ermitteln zu können, sollte sich nochmal die Funktionsweise des Fingolimods vor Augen geführt werden.

Auch über Fingolimod gibt es kontroverse Meinungen in den bisherigen Publikationen und es wird deshalb oft als „Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulator“ bezeichnet, welcher sich als S1P1-Antagonist im Lymphknoten auszeichnet, um die Migration von autoreaktiven T-Lymphozyten in das zentrale Nervensystem zu verhindern. Gleichzeitig besitzt Fingolimod eine hohe Affinität zu den S1P1-, S1P3-, S1P4- und S1P5-Rezeptoruntertypen [64].

Da S1P-Rezeptoren ubiquitär im Körper vorkommen und über unterschiedliche G-proteingekoppelte Wege funktionieren [19, 20], ist es in der Tat nachvollziehbar, dass Fingolimod auf unterschiedliche S1P-Rezeptoren im Körper wirken kann.

Sowohl in den PCR- als auch in den Calciumimaging-Experimenten zeigte sich, dass die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren nach Zugabe von Fingolimod direkt gesenkt werden konnte. In den PCRs konnte gezielt gezeigt werden, dass die Subtypen 1 und 3 gesenkt werden. Beim Calciumimaging konnte eine eindeutige Inhibition der S1P1-Rezeptoren über den selektiven S1P1-Inhibitor W123 erzielt werden, während über irreversible Hemmung mit U73122 als Phospholipase C-Inhibitor eine Aktivität der S1P3-Rezeptoren, welche über die Phospholipase C Gq-Protein vermittelt funktionieren, gezeigt werden konnte.

Somit konnte bestätigt werden, dass S1P1 und S1P3 sich in Astrozytenkulturen befinden, welche in weiteren Calciumimaging-Experimenten unter Fingolimod inhibiert wurden und sogar bei Inhibition der S1P3-Rezeptoren über Fingolimod eine Inhibition über die Phospholipase C vermuten lassen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren in Astrozyten durch Fingolimod gesenkt wird und bei der Inhibition der S1P3-Rezeptoren vermuten lassen, dass Fingolimod zusätzlich als funktioneller Phospholipase C-Inhibitor funktioniert.

Wie eingangs beschrieben sind überwiegend die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren 1 und 3 in Astrozyten bei an Multipler Sklerose erkrankten Patienten überstimuliert und steigern die Zytokinausschüttung, so dass vermehrt Neurone absterben [56].

Indem Fingolimod die astrozytären Sphingosin-Phosphat-Rezeptordichte senkt, erklärt dies zusätzlich zu seiner peripher gewünschten Wirkung auf die Lymphknoten den zuvor vermuteten neuroprotektiven Effekt.

Als Lösemittel für das Fingolimod wurde DMSO verwendet, da es geeignet ist hydrophobe Substanzen zu lösen. Während der PCR-Versuchsreihen gab es Experimente, in denen die Astrozyten etwas fragiler waren und viele Zellen abgestorben sind. Dies lässt sich durch den zytotoxischen Effekt von DMSO auf Astrozyten erklären, der dazu führt, dass u.a. oxidativer Stress, Apoptose und eine Verminderung der Glutamatrezeptorexpression ausgelöst werden [57]. Im Datasheet des in den Experimenten verwendeten Fingolimods wurde als Lösemittel Chloroform empfohlen. In den Versuchsreihen zeigte sich Chloroform ungeeignet, da es einen noch eindrucksvolleren zytotoxischen Effekt aufwies und Chloroform zudem auch als fester Bestandteil der RNA-Extraktion verwendet wird, wodurch die Dosis viel zu hoch wird.

Die Schwankungen in der DMSO-Kontrolle lassen sich zwar nicht ganz erklären, allerdings könnte die leichte Senkung in der DMSO-Kontrolle bei den Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptoren durch die Zytotoxizität vermutet werden, da die Inkubation mit 24 Stunden lang erscheint. Die leichte Steigerung der Sphingosin-1-Phosphat-3-Rezeptoren könnte ebenso durch die Schädigung der Astrozyten und ggf. als Kompensationsmechanismus erfolgte vorbeschriebene Überstimulation der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren wie sie bei Neuroinflammation beschrieben wurde, zu deuten sein.

6. Schlussfolgerungen

Nach eingehender Betrachtung konnte nicht nur ein besseres Verständnis des neuroprotektiven Effekts von Fingolimod, sondern auch ein differenziertes Bild über die Veränderung der Funktionsweise von Astrozyten bei MS geschaffen werden.

Der direkte Effekt von Fingolimod auf Astrozyten zeigt sich durch eine Senkung der astrozytären Sphingosin-Phosphat-Rezeptoren.

Nach Inkubation mit Fingolimod, wurden die S1P1- und S1P3-Rezeptorexpression der Astrozytenkulturen gesenkt. Auch in den Calciumimagingexperimenten bestätigte sich die Hemmung der S1P-Rezeptoren nach Zugabe von Fingolimod, in dem nach Stimulation der Astrozyten keine Calciumausschüttung als Reaktion gemessen werden konnte.

Durch den Vergleich der Hemmung der S1P-Rezeptoren durch Fingolimod mit der Hemmung durch W123 als selektiven S1P1-Rezeptorantagonisten konnte bestätigt werden, dass Fingolimod nicht nur die Expression von S1P1-Rezeptoren, sondern auch die in unseren Astrozytenkulturen prominent vorhandenen S1P3-Rezeptoren inhibiert.

Außerdem konnte durch irreversible Hemmung der Phospholipase C über U73122 gezeigt werden, dass ein Gq-gekoppelter Mechanismus vorherrscht. In diesem Zusammenhang wird die Wirkung des Fingolimods auf S1P3-Rezeptoren als Inhibition der Phospholipase C-Kaskade gewertet und somit Fingolimod als Sphingosin-1-Phosphat-Modulator noch weitere Funktionsweisen zugesteht.

Zusammenfassend sind Astrozyten in einem gesunden Milieu essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS, können aber unter einer Störung des Gleichgewichtes mit Neuroinflammation und Neurodegeneration wie bei der Multiplen Sklerose zusätzlich für unkontrolliertes Wachstum und übersteigerte Stimulation zur Degeneration von umliegenden funktionalem Gewebe führen.

Durch den Einsatz von Fingolimod kann somit einer Überexpression der S1P1- und S1P3-Rezeptoren bei Astrozyten entgegen gewirkt und somit der vorherbeschriebene „neuroprotektive Effekt“ unter zusätzlicher funktioneller Inhibition der Phospholipase C erzielt werden.

7. Anhang

7.1.Tabellen

Allgemeine Materialien	
24 Well Platten	Greiner Bio one; Cellstar
Absaugpumpe (Werkbank)	KNF Lab-Laboport
Bunsenbrenner	Gasprofi 1; WLD Tec
Coverslips	12 mm VWR
Deckglas	10 Haemocytometer 22x22x0,4mm
Eismaschine	Manitowoc
Eppendorf-Tubes	<i>Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5 mL</i>
Falcon-Tubes (50 ml)	Cellstar Greiner Bio one
Pipetten (5, 10, 20 ml), sterile	Costar Stripette
Lichtmikroskop (Präparation)	Olympus Tokyo 325993
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Leitz Fluovert
Non-pyrogenic Filter 20 µm, sterile	Sarstedt
Octenisept	Schülke
Original Perfusor Syringe 50 ml Luer Lock	Braun
Pasteurpipetten aus Glas	230 mm, Brand
Pasteur-Plast Pipetten	Ratiolab
Pipet boy	IBS Pipet boy acu
Pipettenspitzen normal	Tip one Star lab
Schüttler	New Brunswick Scientific; Excella E24 Incubator Shaker Series
Stepper	Star lab
Thoma Zellkammer	Optik Labor; 0,100 mm Tiefe; 0,0025mm ²
Ultraschallreiniger	Bandelin Sonorex
Wärmeblock	Eppendorf Thermomixer compact
Wasserbad	Julabo

Spritzen 5, 10, 20 ml	Omnifix B.Braun
Waage (fein)	Mettler Toledo
Waage (grob)	Kern KB
Zentrifuge (Zellkultur)	Eppendorf Centrifuge 5804
Zellkultur	
2-Propanol	Merck
BSA (10% in PBS)	Sigma-Aldrich
Chloroform (Chloroform zur Analyse EMSURE® ACS,ISO, Reag. Ph Eur)	Merck Millipore
DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat zugesetztes Wasser, welches RNAsen inaktivieren soll)	
Destilliertes Wasser (Aqua B.Braun, 1000 ml)	Ecotainer
DMSO (Dimethylsulfoxide (Hybri-Max))	Sigma
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	PAA laboratories
Ethanol (96% ~ 100%, vergällt)	Merck
F-12 Nut Mix (Ham)	Gibco
Fingolimod (FTY720 (S)-Phosphat)	Cayman Chemical
Glycogen (Glycogen for mol. biol. 20 mg)	Roche
HEPES Puffer	Sigma
Isofluran	Actavis
Kulturflaschen (Bio one Cellstar cell culture flasks; 250ml)	Greiner
L-Glutamin	Gibco
N2-Supplement	Gibco

Penicillin/Streptomycin, 5000 U (Pen/strep)	Gibco
PFA, 4% (Paraformaldehyde); pH 7,4, prilled 95%	Sigma-Aldrich
Phalloidin	Fluorescein isothiocyanate labeled
Poly-D-Lysine (PDL) 10mg/ml	Gibco
TBS	beinhaltet 0,05% Tween 20, 0,1% Triton X
Triton X-100	Sigma
Trizol-Reagent	Gibco
0,05% Trypsin-EDTA	Gibco
Trypanblau	Sigma; 20ml Trypan blue solution
Tween 20	Merck-Schuchardt; 500 ml
Nährmedien	
Wachstumsmedium	500 ml DMEM 5 ml Pen/Strep 5 ml Glutamin 55 ml 10% FBS (Fetal Bovine Serum)
Differenzierungsmedium	375ml DMEM 125 ml F12 Mix 5 ml Glutamin 5 ml N2-Supplement
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	500ml ; Gibco by life technologies
FBS (Fetal bovine serum)	Lonza Biowhittaker; Brazilian origin

Präparierbesteck

„1 große Präparationsschere

1 kleine Präparationsschere

1 Pinzette (14cm; 1x2 Zähne)

1 gebogene Mikropinzette (Spitzen 0,4 mm; Dumont Nr.7)

1 abgewinkelte Mikropinzette (Spitzen 0,3 mm)

1 gerade Mikropinzette (Spitzen 0,15 mm; Dumont Nr.5)

1 Mikrospatel (Martin; # 34-787-13)

1 Skalpell

Präparationszubehör

Werkbank mit horizontalem Luftstrom

Werkbank mit laminaren Luftstrom

Stereolupe

Sterile Mullkompressen

1 Plastikbecher mit Deckel

3 Bechergläser mit 70%igem Ethanol

1 Abfallgefäß für die getöteten Tiere

5 sterile Falcon-Tubes (50 ml)

1 Falcon-Tube-Ständer

Kleine Petrischalen (60 x 10 mm)“ [65]

PCR	
96-Well-PCR-Platte	MicroAmp Optical 96-Reaction Plate; Applied Biosystems
Abdeckfolie für PCR-Platte	Micro Amp, Optical Adhesive Film; Applied Biosystems
Mikro-Schraubröhre 2 ml PP steril	Sarstedt
Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer; Peqlab Biotechnologie GmbH
PCR-Block	Gene Amp PCR System 9700
PCR-Cycler	Abi Prism 7000 real time PCR Machine/ 7000 Sequence Detection System
Pipettenspitzen gestopft	Tip one Star lab
Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Complete Mini)	Roche
S1P-Rezeptor	Cayman Chemical
Streptavidin 594 (rot)	Vector; DyLight

Sybr Green	Power Sybr Green PCR Master Mix; Applied biosystems
Tubes für PCR-Mastermix	PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2ml, farbl.gem.; Biozym Scientific
Zellmörser	Polytron PT 2100 (Kinematica)
Zentrifuge (RNA-Extraktion)	Hettich Zentrifugen EBA 12 R

Primer

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
Rpl13a, desalted	Fw. Ccc tcc acc cta tga caa ga Rv. Ggt act tcc acc cga cct c Invitrogen
Sdha, desalted	Fw. Ccc tga gca ttg cag aat c Rv. Cat ttg cct taa tcg gag ga Invitrogen
Gapdh	Fw: Ttc acc acc atg gag aag gc Rv: Ggc atg gac tgt ggt cat ga Invitrogen
18 S RNA	PE Applied Biosystems 4319413E
S1P1	Fw: tct tct gca cca ccg tct t Rv: tcc tgc agt aga gga tga cga Invitrogen
S1P2	Fw: gtg ctt gtg ggg ggt cta gc Rv: tgg gag aga tga ttc agc aa Invitrogen
S1P3	Fw: atc tta gca acg ggt cca c Rv: tag gga cag tga tta acc ca Invitrogen
S1P3	Fw: acg cgc gca tct act tcc t Rv: tgg atc tct cgg agt tgt ggt t Tham
S1P4	Fw: atg ctt gga acg gtt tag gc

	Rv: atc acc tgg cac ctg etc Invitrogen
S1P5	Fw: gac cgt aag cct agt cca a Rv: ttg gta gct gat atc tgg caa aa Invitrogen
Rat iNOS L12562	Fw: ctc agc aca gag ggc tca ag Rv: tgc acc caa aca cca agg t Invitrogen

Reagenzien-Kits	
Taqman (Reverse Transcription) <ul style="list-style-type: none"> - Buffer - MgCl₂ - dNTPs - RanHex - RNase Inhib - Reverse Transkriptase 	Applied Biosystems Roche
EnzChek Direct Phospholipase C Assay	Invitrogen

Calciumimaging	
4 Well Platten	Nunc
Calciumimaging Mikroskop	Nikon Eclipse FN1
Calciumimaging Objektiv	Olympus (LUMPlanFl; 40x/0.80 w; ∞/0)
Fura-2 AM (20x50µg)	Life technologies (Invitrogen)
U73122	Sigma
W123	Cayman Chemical

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Skatchkov, S.N., M.A. Woodbury-Farina, and M. Eaton, *The role of glia in stress: polyamines and brain disorders*. Psychiatr Clin North Am, 2014. **37**(4): p. 653-78.
2. Peppiatt, C.M., et al., *Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes*. Nature, 2006. **443**(7112): p. 700-4.
3. Cabezas, R., et al., *Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 211.
4. Corraliza, I., *Recruiting specialized macrophages across the borders to restore brain functions*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 262.
5. Ulfing, N., *Kurzlehrbuch Neuroanatomie*. 2008.
6. Xiao, L., C. Saiki, and R. Ide, *Stem cell therapy for central nerve system injuries: glial cells hold the key*. Neural Regen Res, 2014. **9**(13): p. 1253-60.
7. Marrie, R.A., *Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology*. Lancet Neurol, 2004. **3**(12): p. 709-18.
8. Kawabori, M. and M.A. Yenari, *The role of the microglia in acute CNS injury*. Metab Brain Dis, 2015. **30**(2): p. 381-92.
9. Suzuki, R. and A. Nishiyama, *[Polydendrocytes--their roles in development and glial tumor formation]*. Brain Nerve, 2009. **61**(7): p. 733-9.
10. Abney, E.R., B.P. Williams, and M.C. Raff, *Tracing the development of oligodendrocytes from precursor cells using monoclonal antibodies, fluorescence-activated cell sorting, and cell culture*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 166-71.
11. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(1): p. 41-53.
12. Suarez, I., G. Bodega, and B. Fernandez, *Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia*. Neurochem Int, 2002. **41**(2-3): p. 123-42.
13. Li, L., et al., *Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(3): p. 468-81.
14. Bassi, R., et al., *Sphingosine-1-phosphate is released by cerebellar astrocytes in response to bFGF and induces astrocyte proliferation through Gi-protein-coupled receptors*. Glia, 2006. **53**(6): p. 621-30.
15. Martinez-Altarrriba, M.C., et al., *[A review of multiple sclerosis (1). Presentation of a case]*. Semergen, 2015. **41**(5): p. 261-5.
16. Chun, J. and H.P. Hartung, *Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis*. Clin Neuropharmacol, 2010. **33**(2): p. 91-101.
17. Tham, C.S., et al., *Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression*. Int J Dev Neurosci, 2003. **21**(8): p. 431-43.
18. Soliven, B., V. Miron, and J. Chun, *The neurobiology of sphingosine 1-phosphate signaling and sphingosine 1-phosphate receptor modulators*. Neurology, 2011. **76**(8 Suppl 3): p. S9-14.
19. Van Doorn, R., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 3 are upregulated in multiple sclerosis lesions*. Glia, 2010. **58**(12): p. 1465-76.
20. Cohen, J.A. and J. Chun, *Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2011. **69**(5): p. 759-77.
21. Anelli, V., et al., *Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes*. J Neurochem, 2005. **92**(5): p. 1204-15.
22. Brinkmann, V., *Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology*. Pharmacol Ther, 2007. **115**(1): p. 84-105.
23. Herr, D.R. and J. Chun, *Effects of LPA and SIP on the nervous system and implications for their involvement in disease*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(1): p. 155-67.
24. Gerd P. Püschel, H.K., Thomas Kietzmann, Wolfgang Höhne, Bruno Christ *Taschenlehrbuch Biochemie*. Kapitel 2.6. Hormone und Mechanismen der Signaltransduktion Georg Thieme Verlag
25. William K. Purves, D.S., Gordon H. Orians, H. Craig Heller *Biologie*. 2006: Jürgen Markl.
26. Rao, T.S., et al., *Pharmacological characterization of lysophospholipid receptor signal transduction pathways in rat cerebrocortical astrocytes*. Brain Res, 2003. **990**(1-2): p. 182-94.
27. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
28. Wei, S.H., et al., *Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial*
29. Chiba, Y., et al., *Downregulation of sphingosine-1-phosphate receptors in bronchial smooth muscle of mouse experimental asthma*. Pharmacol Res, 2010. **62**(4): p. 357-63.

30. Weinstock-Guttman, B., *An update on new and emerging therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis*. Am J Manag Care, 2013. **19**(17 Suppl): p. s343-54.
31. Brinkmann, V., *FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(5): p. 1173-82.
32. Graler, M.H. and E.J. Goetzl, *The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors*. FASEB J, 2004. **18**(3): p. 551-3.
33. Mandala, S., et al., *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists*. Science, 2002. **296**(5566): p. 346-9.
34. Brinkmann, V., et al., *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21453-7.
35. Brinkmann, V., J.G. Cyster, and T. Hla, *FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function*. Am J Transplant, 2004. **4**(7): p. 1019-25.
36. Liu, R., et al., *Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 996469.
37. Sarah Hoffmann, K.V., Stefanie Mache, Michael Spallek, David Quarcoo, David A. Groneberg, Stefanie Uibel, *Multiple Sklerose: Epidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie*.
38. Lassmann, H., W. Bruck, and C.F. Lucchinetti, *The immunopathology of multiple sclerosis: an overview*. Brain Pathol, 2007. **17**(2): p. 210-8.
39. Correale, J. and A. Villa, *The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting*. Autoimmunity, 2007. **40**(2): p. 148-60.
40. Hartung, H.P., et al., *Immune regulation of multiple sclerosis*. Handb Clin Neurol, 2014. **122**: p. 3-14.
41. Fields, R.D., *Visualizing calcium signaling in astrocytes*. Sci Signal, 2010. **3**(147): p. tr5.
42. Orellana, J.A. and J. Stehberg, *Hemichannels: new roles in astroglial function*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 193.
43. Yoneda, Y. and K. Ogita, [*Current topics on glutamate receptors*]. Yakugaku Zasshi, 1991. **111**(7): p. 329-44.
44. Valenti, O., P.J. Conn, and M.J. Marino, *Distinct physiological roles of the Gq-coupled metabotropic glutamate receptors Co-expressed in the same neuronal populations*. J Cell Physiol, 2002. **191**(2): p. 125-37.
45. Marchetti, C., G. Taccola, and A. Nistri, *Distinct subtypes of group I metabotropic glutamate receptors on rat spinal neurons mediate complex facilitatory and inhibitory effects*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(7): p. 1873-83.
46. Mao, L., et al., *Group III metabotropic glutamate receptors and drug addiction*. Front Med, 2013. **7**(4): p. 445-51.
47. Xie, A.X., et al., *Inducing plasticity of astrocytic receptors by manipulation of neuronal firing rates*. J Vis Exp, 2014(85).
48. Baubet, V., et al., *Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7260-5.
49. Granatiero, V., et al., *The use of aequorin and its variants for Ca²⁺ measurements*. Cold Spring Harb Protoc, 2014. **2014**(1): p. 9-16.
50. Laura Fedrizzi, M.B., *Calcium Measurement Methods Bioluminescent Ca²⁺ Indicators*. December 2009.
51. Lohr, C. and J.W. Deitmer, *Calcium signaling in invertebrate glial cells*. Glia, 2006. **54**(7): p. 642-649.
52. Tanious, F.A., et al., *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites*. Biochemistry, 1992. **31**(12): p. 3103-12.
53. Barcellona, M.L., G. Cardiel, and E. Gratton, *Time-resolved fluorescence of DAPI in solution and bound to polydeoxynucleotides*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **170**(1): p. 270-80.
54. Ding, Y., et al., *Intense exercise can cause excessive apoptosis and synapse plasticity damage in rat hippocampus through Ca²⁺(+) overload and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis pathway*. Chin Med J (Engl), 2014. **127**(18): p. 3265-71.
55. McCall, M.A., et al., *Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6361-6.
56. Colombo, E., et al., *Fingolimod may support neuroprotection via blockade of astrocyte nitric oxide*. Ann Neurol, 2014. **76**(3): p. 325-37.
57. Yuan, C., et al., *Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107447.
58. Silver, N., et al., *Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 33.
59. Joachim Deitmer, D.S., *CA²⁺ und pH. Ionenmessungen in Zellen und Geweben*. 8. August 2000.

60. Wheeler, M.A. and F.J. Quintana, *Regulation of Astrocyte Functions in Multiple Sclerosis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019. **9**(1).
61. Liddelow, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia*. Nature, 2017. **541**(7638): p. 481-487.
62. Ludwin, S.K., et al., *Astrocytes in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2016. **22**(9): p. 1114-24.
63. Green, M.R. and J. Sambrook, *Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data*. Cold Spring Harb Protoc, 2018. **2018**(10).
64. Chiba, K. and K. Adachi, *Sphingosine 1-phosphate receptor 1 as a useful target for treatment of multiple sclerosis*. Pharmaceuticals (Basel), 2012. **5**(5): p. 514-28.
65. Ziegler, B., *Gewinnung astroglialer Dissoziationskulturen aus dem cerebralen Cortex von 0-1 Tage alten Wistar-Ratten*.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne allen danken, die es mir ermöglicht haben mein Promotionsvorhaben zu verwirklichen.

Meinem Doktorvater Prof. Bernd Kieseier und meiner Co-Betreuerin Frau Dr. Leila Husseini danke ich für die Supervision, der Ermutigung zur Selbstständigkeit und dem Durchhaltevermögen die Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Neurologie des UKDs, insbesondere Herrn Prof. Schnitzler, Frau Brigida Ziegler und Herrn Dr. Peter Göttle.

Frau Prof. Christine Rose und Frau Claudia Roderigo aus dem Institut für Neurobiologie danke ich für die Kooperation bezüglich der Calciumimaging Experimente.

Dem Graduiertenkolleg danke ich, dass Sie immer erreichbar waren und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie und Freunden für die emotionale Unterstützung, sowie vor allem bei meinem Mann, meinen Eltern, meinen Schwiegereltern und meiner Schwägerin für die Betreuung meines Sohnes, um auch ungestörte Stunden nutzen zu können, in denen ich an meiner Promotion arbeiten konnte. Meinen beiden Brüdern danke ich, dass ich sie jederzeit anrufen konnte.