Aus der Klinik für Neurologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. rer nat. Sven Meuth

EFFEKTE VON DIMETHYLFUMARAT AUF NEUROPROTEKTION UND IMMUNMODULATION

Dissertation

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

> vorgelegt von Imane Bouchachia 2024

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Philipp Albrecht

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Drittgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Nicole Schupp

Widmungen

Meinem lieben Vater.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Albrecht P, Bouchachia I, Zimmermann C, Hofstetter H, Kovacs Z, Henke N, Lisak D, Issberner A, Lewerenz J, Maher P, Goebels N, Quasthoff K, Mausberg A.K, Hartung H.P, Methner A. Effects of dimethylfumarate on neuroprotection and immunomodulation.

Journal of Neuroinflammation 2012, 9:163

(übernommene Abbildungen sind lizenziert unter der Lizenz Creative Commons Namensnennung CC BY 2.0, https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/)

Zusammenfassung

Effekte von Dimethylfumarat auf Neuroprotektion und Immunmodulation

entzündliche Multiple Sklerose ist die häufigste Erkrankung Zentralnervensystems (ZNS) in westlichen Industrienationen. Weltweit sind rund 2,5 Millionen Menschen betroffen. Charakteristisch sind fokale Entzündungsherde im ZNS mit fokaler Demyelinisierung und Infiltration von Immunzellen. Die Einwanderung der Immunzellen aktiviert Mikroglia als residente Immunzellen des ZNS, was zur Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS / NOS) führt. Diese Radikale verursachen oxidativen Stress. Trotz Zulassung diverser unterschiedlicher Therapeutika, gibt es derzeit noch keine kurative Behandlung der MS. Häufig zeigen die Medikamente einen unzureichenden Effekt auf die Symptomreduktion oder sind nur vorübergehend wirksam. Der Großteil der Behandlungsoptionen wird als Injektion verabreicht und richtet sich vornehmlich gegen die entzündliche Komponente der Erkrankung. Neue Therapieansätze hingegen zielen auf eine Kombination von Immunmodulation und Neuroprotektion, mit dem Ziel, die Wirksamkeit und Langzeitresponsivität zu steigern. Dimethylfumarat (DMF) ist eine oral verabreichte Therapieoption für schubförmigremittierende MS. die nachweislich Schubrate. Krankheitsaktivität sowie -progression senkt. Der molekulare Wirkmechanismus von DMF ist dabei noch nicht gänzlich verstanden. Möglicherweise spielen besagte Kombination aus immunmodulatorischen und neuroprotektiven Mechanismen eine relevante Rolle. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, diese Fragestellung zu adressieren und eine mögliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der neuroprotektiven Effekte von DMF zu untersuchen. Dazu wurde ein *in vitro* Modell für endogenen oxidativen Stress verwendet, um zunächst die protektiven Mechanismen von DMF durch Quantifizierung des zellulären Glutathion-Gehaltes und -Recyclings charakterisieren. Zudem analysierten wir die nukleäre Translokation von Transkriptionsfaktoren und erhoben Genexpressionslevel von antioxidativ wirksamen Enzymen. Wir fanden, dass DMF-Behandlung kurzzeitig oxidativen Stress verursacht, welcher zu einem Anstieg des Transkriptionsfaktors Nrf2 führt. Dieser bewirkt nach Translokation in den Nukleus eine verstärkte Glutathion-Synthese sowie -Recycling in neuronalen Zellen. Zusammenfassend unterstützt diese Arbeit die bisherigen Belege zu positiven Effekten von DMF auf Inflammation und oxidativen Stress bei MS. DMF wirkt bereits in niedrigen Konzentrationen neuroprotektiv durch Reduktion des endogenen oxidativen Stresses. Unsere Beobachtungen tragen damit zum Verständnis der molekularen Wirkweise von DMF bei und lassen vermuten, dass Monomethylfumarat als aktiver Metabolit von DMF ähnliche Effekte aufweist, die lediglich eine längere Zeit benötigen, um sich zu entwickeln.

Abstract

Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immune modulation

Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) in western countries causing neurological disability. Worldwide an estimated 2.5 million people have MS affecting mostly young adults. Pathological characteristics are focal sites of neuroinflammation and focal demyelination subsequent to infiltration of immune cells. Concomitant activation of microglia, the immune cells of the CNS, cause increased production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and NOS) resulting in oxidative stress. To date, there is no cure for MS, although a number of therapies have been approved for treatment. Oftentimes the therapeutic effects are modest or only temporary. Current treatments are most commonly applied by injection and target primarily the inflammatory component of the disease. However, new therapeutic approaches focus on combining immunomodulatory and neuroprotective mechanisms with the aim to enhance the efficacy of the drug.

Dimethyl fumarate (DMF) is an oral drug, which has been shown to reduce the relapse rate of the relapsing-remitting form of MS as well as overall disease activity and progression. The exact mechanism of action remains to be investigated. The drug's efficacy may origin from a combination of both, immunomodulatory and neuroprotective mechanisms.

In the present study, we addressed this issue and aimed to investigate a possible time and concentration dependency in terms of the neuroprotective effects of DMF using an in vitro model for endogenous oxidative stress. To this end, we evaluated the protective mechanisms of DMF by quantification of the cellular glutathione content and its recycling. We furthermore analyzed the nuclear translocation of transcription factors and measured gene expression levels of antioxidant enzymes. We found that DMF leads to short-lived oxidative stress, which results in an increase of transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and its nuclear translocation subsequently enhancing glutathione synthesis and recycling in neuronal cells.

In conclusion, the results of this study provide further evidence for the positive effects of DMF on endogenous oxidative stress in MS. DMF acts in a neuroprotective way even in lower concentrations. Our observations may thus contribute to further understanding the pharmacology of DMF and its mechanism of action. We assume that monomethyl fumarate as the active metabolite of DMF may have similar effects that only need a longer time to evolve.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.2 Oxidativer Stress	4
1.3 GSH-System	5
1.4 Oxidative Glutamat-Toxizität	5
1.5 Dimethylfumarat als Wirkstoff	9
2. Ziel der Arbeit und Fragestellung	11
3. Material und Methoden	12
3.1 Materialien (Chemikalien, Kits, Medien, Zellen, Geräte)	12
3.2. Methoden	15
3.2.1 Fachkundenachweis gemäß Tierschutzgesetz	15
3.2.2 Zell-Kulturen	15
3.2.3 Viabilitäts-Assays	17
3.2.4 Glutathion-Bestimmung	18
3.2.5 Zellfraktionierung, SDS-PAGE und Immunoblot	18
3.2.6 Translokationsanalyse von NF-кВ und Nrf2	18
3.2.7 Quantitative real-time PCR	19
3.2.8 TNF-alpha ELISA	19
3.2.9 Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT)	20

	3.2.10 Extrazellulare Ableitung mit Multi-Elektroden-Arrays und Signalanalyse	. 20
	3.2.11 Statistische Auswertung	. 24
4.	Ergebnisse	. 25
	4.1 Zeit-, Konzentrations- und Nrf2-abhängige Wirkung von DMF	. 25
	4.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von DMF	. 25
	4.1.2 Zeitabhängige Wirkung von DMF	. 27
	4.1.3 Nrf2-abhängige Wirkung von DMF	. 29
	4.2 Protektive Wirkung von DMF und die effiziente Glutathion-Wiederverwertung	. 31
	4.3 Einfluss der protektiven Konzentrationen von DMF auf die Zytokinproduktion in aktivierten Splenozyten	. 34
	4.4 Nur DMF-behandelte neuronale Zellen, nicht aber Splenozyten, führen durch Glutathion-Sekretion zur Erhöhung der extrazellulären Glutathion-Konzentration	. 35
5.	Diskussion	. 39
6.	Literaturverzeichnis	. 44
7.	Publikationsliste	. 50
8.	Danksagungen	. 52

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD 7-Aminoactinomycin

Abb. Abbildung

aCSF Artificial cerebrospinal fluid (engl. künstliches Liquor

cerebrospinalis)

ANOVA Analysis of Variance (engl. Varianzanalyse)

ARE Antioxidant-Response-Element

AU Arbiträre Units/Einheiten

AV Annexin V

BCA bicinchoninic acid (engl. Bicinchoninsäure)

BSO buthionine sulfoximine (engl. Buthioninsulfoximin)

CAT Katalase

CC BY Creative Commons BY (by = Namensnennung)

CD(3) Cluster of differentiation (engl. Differenzierungsmarker)

CTB Cell Titer Blue

CO₂ Kohlenstoffdioxid

CONFIRM Comparator and an oral Fumarate in relapsing-remitting MS

(Phase-III-Studie zu Dimethylfumarat aus 2011)

DCFDA 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat

DMF Dimethylfumarat

DEFINE Determination of the Efficacy and safety of oral Fumarate in

relapsing-remitting MS (Phase-III-Studie zu Dimethylfumarat aus

2012)

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO Dimethylsulfoxid

EAAT excitatory amino acid transporters (engl. exzitatorischer

Aminosäuretransporter)

EDTA Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (engl.

Ethylendiamintetraessigsäure)

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay (engl. antikörperbasiertes

Nachweisverfahren)

FACS fluorescence activated cell sorter (engl. Durchflusszytometer)

FCS fetal calf serum (engl. fetales oder fötales Kälberserum)

GCLC glutamate-cysteine ligase subunit (engl. Glutamatcysteinligase)

GSSG Glutathiondisulfid

GSH Glutathion

GSHPx Glutathion-Peroxidase

HBSS Hank's Balanced Salt Solution

HPRT Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase

IL Interleukin

IFN-y Interferon-y

M Meter

M Mol

MEA Multielektrodenarray

MEF murine embryonale Fibroblasten (emgl. murine embryonic

fibroblasts)

MMF Monomethylfumarat

mRNA Boten-RNA (engl. messenger RNA)

MS Multiple Sklerose

NF-κB nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

(engl. nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter κ-Ketten

(Kappa-Kette) von B-Lymphocyten bindet)

NOS nitric oxide synthetase (engl. Stickstoffmonoxid-Synthase)

NQO1 NADPH-quinone-oxidoreductase-1

Nrf1 Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2

OD Optische Dichte

PBS phosphate buffered saline (engl. Phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR polymerase chain reaction (engl. Polymerase-Kettenreaktion)

PDL Poly-D-Lysin

RNA Ribonukleinsäure

ROI Region of Interest (engl. Bereich von Interesse)

ROOH Hydroperoxid

ROS reactive oxygen species (engl. reaktive Sauerstoffspezies)

S4-CPG (S)-4-Carboxyphenylglycine

SDS- PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, (engl.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

SEM standard error of the mean (engl. Standardfehler des Mittelwerts)

SiN Siliciumnitrid

SJL Swiss Jim Lambert

SOD Superoxid-Dismutase

Splen Splenozyten

TBHQ tert-butyl hydroquinone (engl. 2-tert-Butylhydrochinon)

TMRE Tetramethylrhodamine ethyl ester

TNF Tumor Nekrose Faktor

TNF-alpha tumor necrosis factor alpha (engl. Tumornekrosefaktor-alpha)

Veh. Vehikel (engl. vehicle)

ZNS Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.	3
Abbildung 2: Wirkmechanismus der Glutamat-Toxizität	6
Abbildung 3: Mechanismen des Glutathionmetabolismus: Das Glutamat-Zystin-Antiporte System Xc	
Abbildung 4: Darstellung der Strukturformel von Dimethylfumarat (DMF) und Monomethylfumarat (MMF)1	0
Abbildung 5: Mikroelektroden-Array (MEA) für elektrophysiologische Untersuchungen ar Zellkulturen	
Abbildung 6: Aufbau eines Multi-Elektroden-Array (MEA)2	2
Abbildung 7: Nahaufnahme MEA und Potenzialableitung2	3
Abbildung 8: DMF schützt neuronale Zellen vor oxidativer Glutamat-Toxizität2	5
Abbildung 9: DMF und MMF erhöhen signifikant den zellulären Glutathion Spiegel in hippocampalen HT22-Zellen	6
Abbildung 10: DMF wirkt konzentrationsabhängig protektiv auf die Zellviabilität2	7
Abbildung 11: DMF wirkt schneller als MMF protektiv auf die Zellviabilität2	8
Abbildung 12: DMF reduziert den Glutathion-Gehalt in hippocampalen HT22-Zellen 2	9
Abbildung 13: DMF zeigt keinen Einfluss auf Glutathion-Gehalt in Nrf2-defizienten Zeller	
Abbildung 14: DMF induziert die mRNA-Expression von NRF2-abhängigen antioxidativen Genen	2
Abbildung 15: DMF wirkt auch bei Inhibition der de novo Synthese von Glutathion protektiv	2
Abbildung 16: DMF erhöht zelluläre GSH-Spiegel auch bei Inhibition der Glutathion-Synthese	3
Abbildung 17: DMF in neuroprotektiven Konzentrationen wirkt nicht-toxisch auf primäre Splenozyten	4

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine chronische, inflammatorische und demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) mit den pathologischen Merkmalen von Entzündung, Demyelinisierung, axonalem Verlust und Gliose (Brück und Stadelmann, 2003). In Mitteleuropa stellt Multiple Sklerose die häufigste und weltweit eine der häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar. Die Erkrankung manifestiert sich in zwei Drittel der Fälle im frühen Erwachsenenalter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, nur bei fünf Prozent der Betroffenen zeigen sich die ersten Krankheitszeichen schon im Kindes- oder Jugendalter. Frauen sind bei der Multiplen Sklerose zweimal häufiger als Männer betroffen (Gonsette, 2008).

Die genaue Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bis heute trotz intensiver nicht vollständig geklärt Forschungsanstrengungen (Hafler, 2004). Die vorliegenden Forschungsergebnisse multifaktorielle deuten auf eine Krankheitsentstehung der Multiplen Sklerose hin. Es wird vermutet, dass die Erkrankung ein Resultat von Interaktionen zwischen genetischer Disposition und einem Einfluss von Umweltfaktoren darstellt. Weitere Faktoren für die Anfälligkeit sind etwa Geschlecht und Alter der Patienten zu Krankheitsbeginn (Dyment, 2004).

Die Multiple Sklerose wurde erstmals 1868 von Jean-Martin Charcot, einem französischen Pathologen und Neurologen, beschrieben. Als charakteristische Symptome der Multiplen Sklerose galt damals der sogenannte Symptomkomplex Charcot-Trias I aus Nystagmus, Intentionstremor und skandierender Sprache (Charcot 1868). Dieser Symptomkomplex tritt vergleichsweise selten auf, und zwar bei nur ca. 15 % der Multiple-Sklerose-Erkrankten auf. Sehr häufig ist bei Multiple Sklerose-Erkrankten eine Kombination von neurologischen Symptomen, wie u.a. zentralen Paresen und Sensibilitätsstörungen, begleitet von einer Ataxie und

Miktionsstörungen zu beobachten. Dabei sind insbesondere Hände und Beine von den Sensibilitätsstörungen betroffen. Die Erkrankung manifestiert sich in etwa einem Drittel der Fälle zunächst in Form von Sehstörungen im Rahmen einer akuten Optikusneuritis (Retrobulbär-Neuritis). Die Multiple Sklerose stellt demnach eine sehr heterogene Erkrankung dar, was sich sowohl im klinischen Verlauf, in der bildgebenden Diagnostik als auch in der Therapieresponsivität zeigt (Sospedra und Martin 2005).

Zudem tritt die Erkrankung in verschiedenen Verlaufsformen auf. Im Wesentlichen werden die beiden nachstehenden Verlaufsformen unterschieden:

- der schubförmig-remittierende Verlauf und
- der voranschreitende (progrediente) Verlauf

In ca. 85-90 % der Fälle liegt ein schubförmig-remittierender Verlauf (*relapsing-remitting* MS) vor (Sospedra und Martin 2005). Bei dieser Verlaufsform erfolgt die Schubrate unregelmäßig und zeitlich unabhängig voneinander (Abbildung 1). Während eines Schubes verschlechtern sich die Symptome des Patienten oder es kommen neue hinzu. Bei kompletter Remission bilden sich die Krankheitszeichen nach Ende des Schubes vollständig zurück. Der Definition nach wird von einem Schub gesprochen, wenn die Verschlechterung der Symptome über mindestens 24 Stunden anhält und keiner anderen pathologischen Ursache wie einem fiebrigen Infekt zugrunde liegen. Die Dauer eines Schubes ist unterschiedlich und kann sich von Tagen bis zu einigen Wochen erstrecken. Zwischen den Schüben bleibt der Krankheitszustand relativ unverändert.

Häufig geht die schubförmig-remittierende MS später in einen schubförmigprogredienten Krankheitsverlauf über, bei denen die Schübe in einer inkompletten Remission enden, d.h. einer unvollständigen Rückbildung der Symptome. Bleibende Funktionsstörungen als Residuum der Schübe resultieren über die Zeit in einer progredienten Behinderung der MS-Patienten (Abbildung 1, unten).

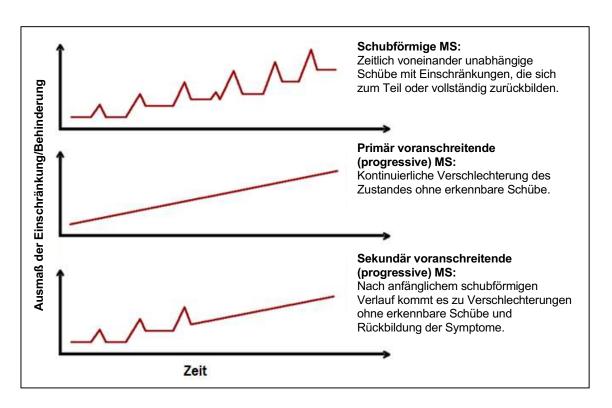


Abbildung 1: Darstellung der Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.

Schubförmige MS verursacht unvorhersehbare Krankheitsschübe, die sich zurückbilden, zumeist nur initial vollständig, im Verlauf dann nur partiell. Bei primär progressiver MS kommt es von Beginn an zu einer kontinuierlichen, schleichenden Verschlechterung ohne erkennbare Schübe. Sekundär progressive MS beginnt initial mit Schüben, die im Verlauf der Erkrankung in eine kontinuierliche Verschlechterung übergehen (Darstellung in Anlehnung an Lublin et al., 1996).

Eine weitere Verlaufsform wird als primär chronischer Verlauf (primary-progressive MS; PP-MS) bezeichnet, wobei nur rund 10 bis 15 % der MS Fälle initial als PP-MS kategorisiert werden. Primär chronische MS ist nicht durch Schübe charakterisiert, sondern durch eine kontinuierliche Progression der Krankheit (Abbildung 1, mittig) ohne Remission. Die Symptome resultieren, wie auch bei den anderen Verlaufsformen, aus einer Entzündungsreaktion im ZNS, verschlechtern sich aber kontinuierlich und schleichend (Sospedra und Martin 2005).

Auch wenn die genauen Ursachen der Multiplen Sklerose nicht vollständig aufgeklärt sind, deuten in jüngster Zeit zahlreiche Studien darauf hin, dass in der Pathophysiologie der MS oxidativer Stress eine zentrale Rolle spielt (Compston und Coles, 2008; Gonsette, 2008; Nave und Trapp, 2008). Es wird vermutet, dass bei der MS die neurodegenerativen Vorgänge zu einer Langzeitbehinderung

führen. Hierbei wird auch diskutiert, ob die autoimmun vermittelte Demyelinisierung reversibel sein könnte (Nikić et al., 2011; Trapp and Nave, 2008). Eine dauerhafte Therapie der MS ist mittels verschiedener Medikamente zur Immunmodulation möglich, darunter Dimethylfumarat, Interferon-β-Präparate, Alemtuzumab, Fingolimod, u.a. Bis heute sind jedoch keine Arzneimittel zugelassen, die eine neuroprotektive Wirkung vermitteln, obwohl inzwischen die neurodegenerativen Aspekte in der Pathogenese der MS bekannt sind.

1.2 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress für Zellen entsteht, wenn die übermäßige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nicht mehr durch antioxidative Schutzmechanismen kompensiert werden kann. Reaktive Sauerstoffspezies sind Sauerstoffverbindungen mit einer hohen Reaktionsfähigkeit, die in den Mitochondrien als Nebenprodukt des Zellstoffwechsels gebildet werden (Schulz et al., 2000).

Die Akkumulation von ROS bei gleichzeitigem Abfall der Konzentration des körpereigenen Antioxidans Glutathion spielt eine Rolle bei akuten und chronischen neurodegenerativen Prozessen bei einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen wie Schlaganfall, Alzheimer und Parkinson (Fridlyand and Philipson, 2005; Lin und Beal, 2006; Madamanchi und Runge, 2007). Die Akkumulation der reaktiven Sauerstoffspezies führt zu einer Schädigung der Zellen und der entstehende oxidative Stress kann nachfolgend den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen (Martindale und Holbrook, 2002). Neuronale Zellen sind besonders anfällig für oxidativen Stress (Finkel & Holbrook, 2000). Diese Anfälligkeit beruht auf dem höheren Gehalt an Lipiden mit ungesättigten Fettsäuren in den Zellmembranen, welche bei oxidativem Stress zu einer Lipidperoxidation mit möglicher Zellschädigung führt, sowie auf einer hohen Stoffwechselaktivität, die mit einer verstärkten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht (Leutner et al., 2001).

1.3 GSH-System

Der Zellorganismus verfügt über verschiedene antioxidative Schutzmechanismen, um sich vor reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen. Darunter ist eine Reihe von nicht-enzymatischen enzymatischen und antioxidativ wirkenden Schutzmechanismen. Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören vor allem die Superoxid-Dismutase (SOD), die Glutathion-Peroxidase (GSHPx) und die Katalase (CAT). In Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, ist die koordinierte Induktion von antioxidativ wirksamen Enzymen ein wichtiger Schutzmechanismus. Das Antioxidant-Response-Element (ARE) enthält enhancer Sequenzen, welche die transkriptionelle Aktivierung von Genen vermitteln (Nguyen et al., 2003). An diesen ARE können Transkriptionsfaktoren wie die NF-E2-related nuclear factor (Nrf1 und Nrf2) binden und somit ARE-vermittelte Genexpression und Induktion regulieren. Dabei ist Nrf2 potenter in der Aktivierung ARE-regulierter Gene als Nrf1 (Jaiswal, 2004).

Eine der wichtigsten Rollen der nichtenzymatischen, antioxidativ wirkenden Schutzmechanismen spielt zudem das Glutathion (GSH) (Schulz et al., 2000). Glutathion ist ein schwefelhaltiges Tripeptid (γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycin), das in allen Zellen des menschlichen Körpers synthetisiert werden kann und Zellen vor oxidativem Stress schützt. Es ist in den meisten tierischen und pflanzlichen Zellen in hoher Konzentration (0,5 mM bis 10 mM) enthalten. GSH ist ein wichtiger Enzymkofaktor und ein bedeutendes wasserlösliches zelluläres Antioxidans, das vor der Einwirkung freier Radikale und deren Folgeprodukten schützt (Schulz et al. 2000).

Der größte Teil des Glutathions liegt intrazellulär als reduziertes GSH vor, nur ein sehr kleiner Anteil des Glutathions liegt in der oxidierten Form als Glutathiondisulfid (GSSG) vor (Siems et al., 1996).

1.4 Oxidative Glutamat-Toxizität

Die protektive Wirkung von DMF wurde in der vorliegenden Arbeit an einem Modell des endogenen oxidativen Stresses in neuronalen Zellen untersucht. Hierbei hat

sich das Modell der oxidativen Glutamat-Toxizität bewährt (Abbildung 2; Albrecht et al., 2010; Tan et al., 2001). In diesem Modell blockieren hohe extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen den Glutamat-Zystin-Antiporter System Xc¯, der Glutamat aus der Zelle heraus und Zystin in die Zelle hinein transportiert. Folglich liegt intrazellulär weniger Zystin als Substrat vor, wodurch dieses als limitierender Faktor bei der Glutathion-Synthese fungiert. Nachfolgend erfolgt so eine Depletion des wichtigsten zellulären Antioxidans Glutathion und die Zelle geht, durch oxidativen Stress ausgelöst, in die Apoptose.

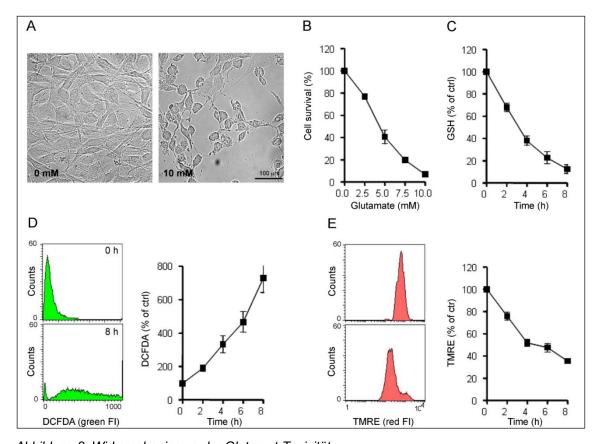


Abbildung 2: Wirkmechanismus der Glutamat-Toxizität.

(A) Zellschrumpfung/Zelltod: Phasenkontrastmikroskopie von HT22-Zellen nach 12-stündiger Exposition gegenüber Vehikel oder 10 mM Glutamat, (B) konzentrationsabhängiger Zelltod als Reaktion auf Glutamat nach 24h, (C) Depletion / Abnahme des intrazellulären Antioxidans Glutathion (GSH) nach Exposition gegenüber 10 mM Glutamat in den angegebenen Zeiträumen, (D) Akkumulation intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies durch Nachweis von DCFDA, (E) Zusammenbruch des Mitochondrienmembranpotentials mittels TMRE-Fluoreszenzintensität (Fl) nach Exposition gegenüber 10 mM Glutamat bestimmt (Albrecht et al., 2010). Abdruckgenehmigung mit der ID:1321029-1 erteilt durch Copyright Clearance Center im Namen des Rechteinhabers Eureka Science.

Das für das Modell der oxidativen Glutamat-Toxizität relevante xCT, die funktionelle Einheit dieses Glutamat-Zystin-Antiporters (Abbildung 2) wird über den protektiven NRF2-*Pathway* reguliert.

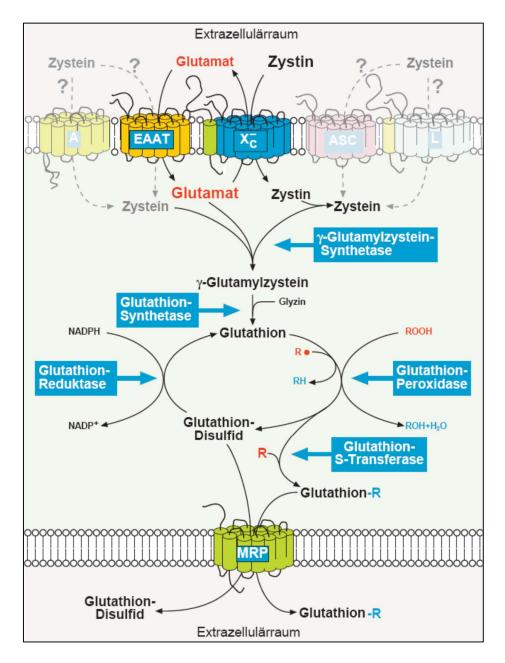


Abbildung 3: Mechanismen des Glutathionmetabolismus: Das Glutamat-Zystin-Antiporter System Xc^- .

Aus dem Extrazellulärraum wird Zystin über den Transmembrantransporter X-c im Austausch mit Glutamat in die Nervenzelle aufgenommen. Dabei erfolgt der Transport entlang des Konzentrationsgefälles von Glutamat. Der Austausch wird durch Glutamattransporter (EAAT) unterstützt, die in der Zellmembran liegen. Diese Transporter fördern die intrazelluläre Anreicherung und die zeitgleiche extrazelluläre Verminderung von Glutamat. Im Zellinneren wird

das so eingeschleuste Zystin zu Zystein reduziert. Zystein wird nachfolgend für die Glutathion-Synthese verwendet. Inwiefern über die Transportersysteme A, ASC und L oder EAATs (transparent dargestellt) eine direkte Aufnahme von Zystein vorkommt, ist bisher unbekannt. Die Glutathion-Synthese erfolgt zweischrittig. Zunächst wird durch das Enzym y-Glutamylzystein-Synthetase aus den Bausteinen Glutamat, Zystein und Glyzin das Zwischenprodukt y-Glutamylzystein generiert. Nachfolgend wird über die Glutathion-Synthetase dann Glutathion hergestellt. Das Antioxidans Glutathion reduziert intrazellulär vorliegende freie Radikale (R) nichtenzymatisch. Die Reduktion von Peroxiden (ROOH) wird durch die Glutathion-Peroxidase katalysiert. In beiden Fällen wird Glutathion zu Glutathion-Disulfid oxidiert. Toxische Stoffwechselprodukte (R) werden durch das Enzym Glutathion-S-Transferase kovalent an Glutathion gekoppelt (Glutathion-R). Dieses Produkt wird durch Multiple Resistence Proteins (MRP)-Transporter wieder in den Extrazellulärraum überführt. Dort kann Glutathion-Disulfid NADPH-abhängig von der Glutathion- Reduktase wieder zu reduziertem Glutathion regeneriert werden (Abb. aus Lewerenz und Methner, 2006).

Abdruckgenehmigung mit der ID: 1320996-1 erteilt durch Copyright Clearance Center im Namen des Rechteinhabers Walter de Gruyter and Company.

Dieser NRF2-*Pathway* scheint auch bei der DMF-Protektion eine wichtige Rolle zu spielen (Linker et al., 2011). Der im NRF2-*Pathway* relevante Transkriptionsfaktor "nuclear factor erythroid 2-related factor 2" (Nrf2) spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Proteinexpression, die am Glutathion-Stoffwechsel beteiligt ist.

Nrf2 gehört zu der Gruppe der "Cap'n'Collar basic-leucinzipper"-Transkriptionsfaktoren (He et al., 2007; Zhang, 2006) und wurde erst in den neunziger Jahren entdeckt (Moi et al., 1994). Nrf2 und das Antioxidans-Response-Element (ARE) gehören zu den wichtigsten Schutzmechanismen der Zellen vor oxidativem Stress (Nguyen et al., 2003).

Der oben im Modell beschriebene endogene oxidative Stress wird also durch oxidative Glutamat-Toxizität bzw. extrazelluläres Glutamat ausgelöst. Glutamat ist ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter im ZNS (Maher, 2005). Hohe Glutamat-Konzentrationen sind exzitotoxisch und spielen eine große Rolle bei der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen (Choi, 1988). Der Wirkmechanismus der Glutamat-Toxizität umfasst hierbei:

- (A) Zellschrumpfung/Zelltod
- (B) konzentrationsabhängiger Zelltod verursacht durch:
- (C) Depletion/Abnahme des intrazellulären Antioxidans Glutathion
- (D) Akkumulation intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies und
- (E) Zusammenbruch des Mitochondrienmembranpotentials
- (Lewerenz, 2006)

1.5 Dimethylfumarat als Wirkstoff

Der Wirkstoff Dimethylfumarat ist in Deutschland seit 1994 unter dem Handelsnamen Fumaderm® zur Behandlung der mittelschweren bis schweren Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte) zugelassenen Präparaten enthalten und wird dort erfolgreich eingesetzt (Mrowietz und Asadullah, 2005), nachdem der Biochemiker W. Schweckendiek 1959 erstmals Dimethylfumarat im Selbstversuch getestet hatte (Schweckendiek, 1959).

Bei Fumaderm[®] handelt es sich um eine magensaftresistente Formulierung eines Wirkstoffgemisches aus verschiedenen Estern und Salzen der Fumarsäure, und zwar als Gemisch aus Fumarsäuredimethylester (DMF: Dimethylfumarat) und Kalzium-, Magnesium- und Zinkmonoethylfumarat. Der genaue Wirkmechanismus des Antipsoriatikums bzw. des Wirkstoffs DMF ist allerdings bis heute nicht gänzlich bekannt.

Abbildung 4: Darstellung der Strukturformel von Dimethylfumarat (DMF) und Monomethylfumarat (MMF).

DMF stellt ein Dimethylester der Fumarsäure dar. In vivo wird zugeführtes DMF im alkalischen Milieu des Darms schnell durch Esterasen in seinen aktiven Metaboliten MMF umgewandelt, welcher dann als primärer Hauptmetabolit agiert (Huhn und Linker, 2014).

© Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2014, Abdruckgenehmigung vom 09.02.2023

Nach initialen Einzelfallberichten über eine Schubratenreduktion bei Multipler Sklerose wurde DMF in einem klinischen Entwicklungsprogramm untersucht. In verschiedenen Studien der Phase-II und Phase-III (zum Zeitpunkt dieser Arbeit: Phase-II) konnte das Einsatzgebiet von DMF ausgeweitet werden und DMF zeigte sich als ein neues vielversprechendes orales Therapeutikum, das die Krankheitsaktivität und die Schubrate bei der schubförmig remittierenden Verlaufsform der Multiplen Sklerose (RR-MS) signifikant senkt (Kappos et al. 2008; Huhn und Linker, 2014). So zeigen Daten der Phase-III-Studien DEFINE (Determination of the efficacy and safety of oral fumarate in relapsing-remitting MS) und CONFIRM (Comparator and an oral fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis), dass die Schubrate und Behinderungsprogression durch orale Dimethylfumarat-Gabe signifikant gesenkt werden konnte. Mehr als 50 % der neu diagnostizierten Patienten waren für sechs Jahre frei von Rezidiven und Progression. (Fox et al. 2012; Gold et al. 2012)

2. Ziel der Arbeit und Fragestellung

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die Wirkmechanismen von Dimethylfumarat auf die Neuroprotektion und die Immunmodulation näher zu untersuchen. Hierbei sind die neuroprotektiven Effekte von Dimethylfumarat zu analysieren sowie u.a. zu klären,

- welchen Einfluss neuroprotektive Konzentrationen von Dimethylfumarat auf die Immunmodulation haben,
- wie die Wechselwirkungen zwischen neuronalen und Immunzellen sind und
- wie der Einfluss von Dimethylfumarat auf neuronale Funktionen ist.

Dimethylfumarat scheint seine klinische Wirkung über eine duale Wirkungsweise zu entfalten. Zum einen scheint Dimethylfumarat durch eine antioxidative Neuroprotektion, zum anderen über einen immunmodulatorischen Weg zu wirken (Compston und Coles, 2008; Gonsette, 2008; Nave und Trapp, 2008). Diese beiden Wirkungsweisen werden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien (Chemikalien, Kits, Medien, Zellen, Geräte)

Chemikalie	Hersteller
Dimethylfumarat (DMF)	Firma Biogen Idec (Carl-Zeiss-Ring 6, 85737 Ismaning, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Georg-Heyken-Str. 14, 2147 Hamburg, Deutschland)
Fam-Tamra markierte Oligonukleotide	Eurofins-MWG-Operon (Anzingerstr. 7A, 85560 Ebersberg, Deutschland)
Monomethylfumarat (MMF)	Firma Biogen Idec (Carl-Zeiss-Ring 6, 85737 Ismaning, Deutschland)
Penicillin und Streptomycin	Gibco/Life Technologies (Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt, Deutschland)
Universal ProbeLibrary™	Roche (Emil-Barell-Str. 1, 79639 Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
7-AAD	Becton Dickinson (Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg, Deutschland)
Weitere Chemikalien	Sigma Aldrich (Georg-Heyken-Str. 14, 2147 Hamburg, Deutschland)

DMF und MMF wurden in DMSO gelöst, welches auch als Vehikel-Kontrolle diente.

Geräte/Material	Hersteller
Hochdurchsatz-Mikroskop	Becton Dickinson (Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg, Deutschland)
Kulturgefäße (Petrischalen etc.)	Greiner Bio-One (Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen, Deutschland)
Multi-Elektroden-Arrays	Multichannel Systems (Aspenhaustrasse 21, 72770 Reutlingen, Deutschland)

Zellen	Herkunft
Hippocampale HT22-Zellen (modifizierter Subklon der murinen Zelllinie HT4 mit erhöhter selektiver Glutamatsensitivität)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Axel Methner
Primäre Kortikalkulturen aus embryonalen Ratten (kryokonserviert)	QBM Cell Science Inc. (1200 Montreal Road, Gebäude M23A, Suite 147, Ottawa, Ontario, Kanada)
Primäre Kortikalkulturen aus Mäusen der Stämme C57BL/6	Tierhaltung der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität (Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf) und Janvier Labs (Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich)
Primäre Splenozyten aus Mäusen der Stämme SJL	Tierhaltung der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität (Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf) und Janvier Labs (Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich)

Medium/Lösung	Hersteller
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	AAP (Unterm Bornrain 2, 35091 Cölbe, Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösungen	AAP (Unterm Bornrain 2, 35091 Cölbe, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Scientific, Rockford, USA

Der pH-Wert aller Medien wurde konstant bei 7,4 gehalten.

Assay/Kit	Hersteller
ImmunoSpot® Analyzer	CTL (2860 Fisher Road, Columbus, OH 43204, USA)
TNF-alpha ELISA-Kits	R&D Systems (Borsigstrasse 7 65205 Wiesbaden, Deutschland)
Zellviabilitäts-Assays CellTiter-Blue	Promega (Schildkrötstraße 15, 68199 Mannheim, Deutschland)

Antikörper/Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
Annexin V PE	Becton Dickinson (Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg, Deutschland)
anti-Aktin Antikörper	Millipore (290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA)
anti-CD3 Antikörper	Becton Dickinson (Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg, Deutschland)
anti-Nrf2 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology (Bergheimer Straße 89, 69115 Heidelberg, Deutschland)
anti-NF-κB Antikörper	Cell Signaling Technologies (3 Trask Lane, Danvers, MA 01923, USA)
Sekundärantikörper	Millipore (290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA)
7-AAD	Becton Dickinson (Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg, Deutschland)

Software	Hersteller
Microsoft Office	Microsoft (Konrad-Zuse-Str. 1, 85716 Unterschleißheim, Deutschland)
Prism	GraphPad Software (2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037, USA)
Spanner (MEA-Analyse-Software)	RESULT Software (47918 Tönisvorst, Deutschland)

3.2. Methoden

3.2.1 Fachkundenachweis gemäß Tierschutzgesetz

Alle Organ- bzw. Zellentnahmen aus Tieren erfolgten entsprechend der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes. Bei den Organ- bzw. Zellentnahmen handelt es sich um ein Organentnahmeprojekt (Aktenzeichen der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität: G 094/06), welches nicht anzeige- oder genehmigungspflichtig ist Ein Fachkundenachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes der Doktorandin liegt vom 18.03.2011 aus Düsseldorf vor.

3.2.2 Zell-Kulturen

Die embryonalen kortikalen Primärzellen aus C57BL/6-Mäusen, die Splenozyten aus SJL-Mäusen und die HT22-Zellen wurden wie folgt kultiviert und präpariert:

1. Die HT22-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem eagle medium (DMEM) mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 5 % FCS bei 37°C im Brutschrank und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden auf 10 cm Platten ausplattiert. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und Zelldichte erfolgte nach ca. zwei bis vier Tagen die Passage der Zellen. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin (0,5 %) (Gibco) mit 0,2 % EDTA (Gibco) abgelöst. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Trypsins mit einer Menge von mindestens dem 10-fachem an Nährmedium (inkl. 5 % Serum). Nach Inaktivierung wurden die Zellen von der Kulturplatte gespült, in

frischem Nährmedium auf die Zellplatten aufgenommen und je nach gewünschter Zellzahl zur weiteren Kultur ausplattiert.

2. Für die Präparation der kortikalen Primärzellen wurden Embryonen des Embryonaltages 14 (E14) verwendet. Das Muttertier wurde fachgerecht durch Genickbruch getötet, die Embryonen entnommen und dekapitiert. Unter Verwendung von mikrochirurgischem Besteck wurde unter einer Sterilbank mittels binokularem Mikroskop embryonales, kortikales Gewebe aus den Mäusen präpariert. Das Gewebe wurde anschließend in einem Zentrifugenröhrchen mit kaltem HBSS gesammelt und auf Eis gelagert, um die Zellen zu konservieren und vor dem Zelltod zu schützen.

Die Präparation der Zellkulturen erfolgte wie nachfolgend beschrieben.

Die Zellsuspension wurde mit 1000 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten bei 37°C zentrifugiert. Anschließend wurde das HBSS im Überstand verworfen und das verbleibende Zellpellet mit 4,8 ml frischen, eiskaltem HBSS unter Zugabe von 500 µL Trypsin mit 50 µL HEPES zwei bis drei Mal mit der Pipette resuspendiert. Das so resuspendierte Zellpellet wurde nachfolgend für 20 Minuten bei 37°C und 5 % CO2 inkubiert. Im Anschluss wurde das Trypsin unter Zugabe von 500 μL FCS mit 50 μL Sojabohnen-Trypsininhibitor und 10 ml HBSS inaktiviert und die Zelllösung mehrfach resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde 1000 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten bei 37°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 10 ml HBSS resuspendiert und erneut zentrifugiert, wie zuvor beschrieben. Nach Verwurf des Überstandes erfolgte die Zugabe von 1 ml Proliferationsmedium (FGF-2 und EGF (20 ng/ml)) und eine achtmalige Resuspendierung mit der Pipette. Nachfolgend wurde die so gereinigte Zellsuspension durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert, die Zellzahl bestimmt und Kulturen mit 100.000 Zellen pro Well auf Poly-L-Ornithin beschichten 96 well-Platten ausplattiert. Die Platten wurden anschließend unter Zugabe von DMF oder MMF, beziehungsweise dem Vehikel bei 37°C und 5 % CO₂, je nach Wachstumsgeschwindigkeit, für 2 bis 3 Tage inkubiert.

3. Für die Präparation und Isolation der Splenozyten wurden 6 bis 8 Wochen alte, weibliche, nicht trächtige Mäuse der Stämme SJL und C57BL/6 verwendet. Die Tiere wurden fachgerecht mit Isofluran betäubt, getötet, die Milz präpariert und diese in 1 ml eiskaltem Waschmedium (DMEM High Glucose mit 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. Das Milzgewebe wurde anschließend unter Verwendung eines Spritzenkolbens durch einen 70 µm Zellenfilter (Falcon BD 352350) homogenisiert, wobei nach höchstens drei Milzen der Zellenfilter erneuert wurde. Das homogenisierte Gewebe wurde dann in 30 ml kaltem Waschmedium verdünnt und für 15 Minuten bei 300g und 4 °C, bzw. für 10 Minuten bei 350g und 4°C, zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstandes erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in 5 ml Lysepuffer (HHU Düsseldorf Pharmacy, Ammoniumchlorid, isotonisch, pH 7,4) mit anschließender Inkubation auf Eis für 3,5 Minuten. Nachfolgend wurde das Splenozyten-Homogenisat mit 30 ml Waschpuffer verdünnt, erneut durch einen 70 µm Zellenfilter gegeben und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Um Zellaggregate zu entfernen, erfolgte dieser Waschschritt zweimal, zuletzt wurde das Pellet dann in Waschmedium aufgenommen und die Zellzahl der isolierte Splenozyten bestimmt.

3.2.3 Viabilitäts-Assays

3.2.3.1 Viabilitäts-Assay der neuronalen Zellen (HT22 und kortikale Primärkulturen)

Die Viabilität der neuronalen Zellen wurde 24 Stunden nach Zugabe von Glutamat mittels CellTiter-Blue (Zellviabilitäts-Assays) gemessen und auf Vehikelbehandelten Zellen normalisiert.

3.2.3.2 Viabilitäts-Assay der Splenozyten

Die Zellviabilität der Splenozyten wurde mittels Durchflusszytometrie von 7-AAD (BD #51-68981E Pharmingen) und Annexin V-PE (BD Pharmingen #556421)

behandelten Zellen bestimmt. Die Färbung der Zellen erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers (PharMingen, Hamburg).

3.2.4 Glutathion-Bestimmung

Die Bestimmung des Glutathion-Gehalts erfolgte enzymatisch nach Lewerenz et al., 2009, die Normalisierung erfolgte auf den Proteingehalt, der mittels BCA-Methode (Bicinchoninsäure/bicinchoninic acid) bestimmt wurde (Micro BCA Protein Assay; Pierce, Rockford, IL, USA).

Das im Zellkulturmedium freigegebene Glutathion wurde ebenfalls enzymatisch bestimmt, nach 4 Stunden Inkubation in Zystin-freiem Medium. Die Normalisierung erfolgte auf den Proteingehalt. Alle Messungen des in das Medium freigesetzten Glutathions erfolgten in Zystin-freien Medium, da Zystin den verwendeten enzymatischen Glutathion-Assay durch Disulfid-Austauschreaktionen mit Glutathion beeinflussen kann.

3.2.5 Zellfraktionierung, SDS-PAGE und Immunoblot

Für die differentielle Detergenzfraktionierung und den Immmunoblot wurden die primären anti-Nrf2-Antikörper (Verdünnung 1:1000; Santa Cruz Biotechnology; #SC13032) und Anti-Aktin-Antikörper (Verdünnung 1:3000; Millipore, MAB1501) verwendet.¹

3.2.6 Translokationsanalyse von NF-kB und Nrf2

Für die Untersuchung der nukleären Translokation von NF-κB wurden HT22-Zellen mit Vehikel sowie zum einen ausschließlich mit 10 ng/ml TNF-alpha und zum anderen mit 10 ng/ml TNF-alpha in Kombination mit 10 μM DMF behandelt (Vehikel: n=1.048 Zellen; DMF: n=943 Zellen; TNF-alpha: n=1.410 Zellen; DMF + TNF-alpha: n=1.085 Zellen). Zellen wurde nachfolgend mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, mit 0,3 % Triton X-100 permeabilisiert, mit 1 x Roti®-ImmunoBlock (Roth

¹ Immunoblotting durchgeführt von P Maher

144.1) blockiert und nachfolgend für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit den Primär-Antikörpern (NF-κB: Cell Signaling #9936 S, Nrf2: SantaCruz #sc-13032) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den fluorochromierten Sekundär-Antikörpern (Millipore #AP132F und #124F). Die intrazelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren wurde mit dem Hochdurchsatz-Mikroskop BD Pathway 855 (BD Biosciences) ermittelt. Die Fluoreszenzintensitäten der zu untersuchenden Bereiche (ROIs; regions of interest) wurden durch Zellkernfärbung mittels DAPI (150 nm) ermittelt und mit den Intensitäten der umgebenden Nuklei und dem entsprechenden Bereich im Zytoplasma normalisiert.²

3.2.7 Quantitative real-time PCR

Die RNA-Extraktion, die reverse Transkription der RNA und die quantitative bzw. Echtzeit-PCR (*Real Time PCR* oder RT-PCR) wurden durchgeführt wie zuvor beschrieben (Lewerenz et al., 2009). Dabei wurden Fam/Dark-Quencher-Sonden aus der Universal Probe LibraryTM (Roche) oder individuelle Fam/Tamra-Sonden (MWG) verwendet. Als endogene Kontroll-Gene dienten entweder beta-Aktin oder HPRT. Diese zeigten keine Expressionsunterschiede nach Inkubation mit DMF.

3.2.8 TNF-alpha ELISA

Primäre Splenozyten von 6 bis 8 Wochen alten weiblichen C57BL/6 und SJL-Mäusen wurden mit 1 μg/ml anti-CD3 (BD Bioscience) stimuliert und mit 1, 10 und 100 μM DMF behandelt. Der Überstand wurde für 48 Stunden gesammelt und die Konzentration von TNF-alpha (Tumornekrosefaktor-alpha) gemäß den Herstellerangaben ermittelt (R&D Systems).³

² Translokationsanalyse durchgeführt von Henke N und Dmitrij L

³ TNF-alpha ELISA-Messungen durchgeführt von Mausberg A.K

3.2.9 Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT)

Die ELISPOT-Messungen (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) erfolgten wie zuvor beschrieben unter Verwendung von Splenozyten aus 6 bis 8 Wochen alten weiblichen C57BL/6 and SJL-Mäusen (Hofstetter et al., 2006).

Die mit 0,5 μg/ml anti-mouse CD3 stimulierten Splenozyten wurden für 24 Stunden mit 10 μM DMF oder Vehikel inkubiert. Die Spots wurden unter Verwendung eines automatisierten ELISPOT-Lesegerätes, dem Immunospot Analyzer (CTL Analyzers LLC, Cleveland, USA), detektiert, ausgezählt und analysiert.⁴

3.2.10 Extrazelluläre Ableitung mit Multi-Elektroden-Arrays und Signalanalyse

Für die extrazelluläre Ableitung mit Multi-Elektroden-Arrays (MEAs) wurden kryokonservierte, dissoziierte, kortikale Neuronen aus Primärkulturen von embryonalen Ratten (Embryonalstadium Tag 18, E18, Firma QBM Cell Science) eingesetzt.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit einer Dichte von 100.000 Zellen/cm² auf Poly-D-Lysin- (PDL) und Laminin-beschichteten MEAs oder Deckgläschen aufgebracht. Die neuronalen Zellkulturen wurden vor der Glutamat-Behandlung im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, bei 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 % für 24 Stunden in Dimethylfumarat bzw. dem Vehikel (DMSO) inkubiert.

Die Messung der neuronalen Aktivität erfolgte bei 37°C und wurde bei sterilen Bedingungen aufgezeichnet unter Verwendung der Multi-Elektroden-Arrays MEAs (Multi Channel Systems). MEAs erlauben eine hochsensible und reproduzierbare Stimulation und Messung der Aktivität neuronaler Zellen. Zur Ableitung solcher extrazellulären Potenziale wurden die oben beschriebenen primären kortikalen Zellen in künstlichem Liquor cerebrospinalis (aCSF) auf der Glasoberfläche von MEAs kultiviert. Durch die 64 in den MEA-Chip eingebetteten Elektroden mit einem

⁴ ELISPOT-Messungen durchgeführt von Zimmermann C und Hofstetter H

Durchmesser von 30 µm ist es möglich, die spontane Netzwerkaktivität und die Signalausbreitung des sich entwickelnden neuronalen Netzwerkes in diesen Zellkulturen nicht-invasiv und in Echtzeit zu beobachten.

Zudem erlauben MEAs es, neuronale Zellen zu stimulieren und die nachfolgende elektrische Zellaktivität orts- und zeitaufgelöst aufzuzeichnen. Die dadurch erreichte räumliche und zeitliche Auflösung ermöglicht die Detektion einzelner Aktionspotenziale. Damit kann eine hochempfindliche, reproduzierbare Beurteilung der neuronalen Netzwerkaktivität durch das Kultivieren kortikaler Zellen direkt auf dem Chip erfolgen.

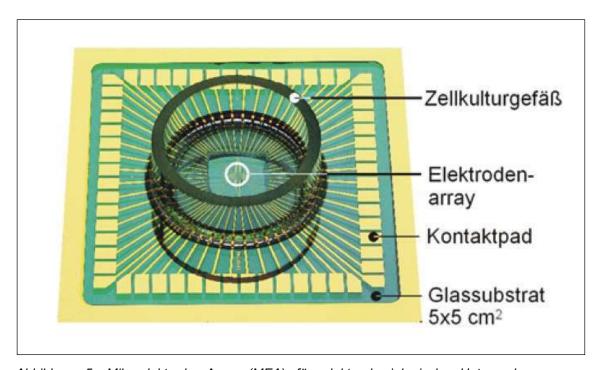


Abbildung 5: Mikroelektroden-Array (MEA) für elektrophysiologische Untersuchungen an Zellkulturen.

MEAs verfügen über 60 sensible, titanbeschichtete Elektroden, um elektrische Aktivität von lebenden und elektrisch aktiven Zellen zu messen. Die Elektroden liegen am Boden eines Zellkulturgefäßes aus Glas. Für akute oder wiederholende Messungen können Zellen in dem Glasgefäß direkt auf dem Chip kultiviert werden. Daneben können auch ganze Gewebeschnitte, z.B. vom Gehirn oder anderen elektrisch aktiven Geweben in Medium auf dem Chip kultiviert werden. Mittels MEA kann so die elektrische Aktivität in unterschiedlichen Bereichen von Zellnetzwerken oder murinen Hirnschnitten erfasst und so eine zeitliche und räumliche Auflösung

der elektrophysiologischen Aktivität dargestellt werden. Das Kontaktpad erlaubt die Aufnahme und Amplifikation der Signale und die Darstellung der Potenziale mittels einer Software.

(Foto: Abdruckgenehmigung des Rechteinhabers Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland wurde erteilt).

Das Elektrodenfeld (Elektrodenarray) befindet sich im Zentrum des sternförmigen Musters, welches in der Mitte des MEAs erkennbar ist. Das Elektrodenfeld ist über Leiterbahnen mit den außenliegenden Kontaktpads verbunden. Das Zellkulturgefäß, das auf dem MEA befestigt ist, ermöglicht die Zugabe von Nährmedium und Badlösung (Abbildung 5).

Da die Materialien zur Herstellung der Elektroden, der Isolierung und des Trägermaterials nicht cytotoxisch wirken, können Zellen auf Multi-Elektroden-Arrays auch für längere Zeit kultiviert werden.

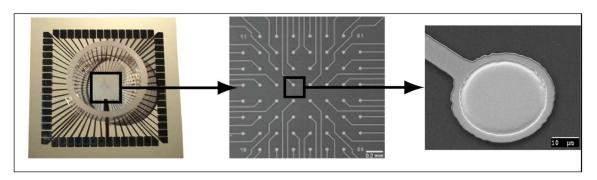


Abbildung 6: Aufbau eines Multi-Elektroden-Array (MEA).

Dargestellt sind ein MEA (links) und daraus vergrößert ein MEA-Elektrodenfeld (Mitte), das sich aus einer Vielzahl von Metallelektroden (rechts) und einer Dünnschichtleiterstruktur zusammensetzt. Links: Übersichtsbild eines MEA (siehe auch Abb. 5). Mitte: Nahaufnahme des Elektronenfeldes Boden des gläsernen Zellkulturgefäßes. Elektroden im Abstand von 200 µm erlauben die Ableitung elektrischer Signale von Zellen. Rechts: Nahaufnahme einer einzelnen Elektrode mit einem Durchmesser von 10 µm.

(Foto: Abdruckgenehmigung des Rechteinhabers Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland wurde erteilt).

Zur Ableitung extrazellulärer Potenziale wurden die Zellen auf der Glasoberfläche von MEAs kultiviert. Die Elektroden haben einen Durchmesser von 10 µm und bestehen aus einer Titan-/Titannitrid-Legierung, die Isolationsschicht aus Siliciumnitrid (SiN).

Die Elektroden sind in einer 1,6 mm² großen, quadratischen 8x8-Matrix mit einem Abstand von jeweils 200 µm voneinander angeordnet (Abbildung 6). Daraus ergibt sich eine große Oberfläche, die eine hohe Signalauflösung ermöglicht.⁵

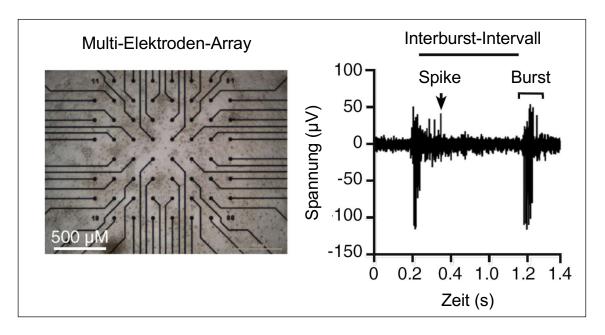


Abbildung 7: Nahaufnahme MEA und Potenzialableitung.

Links: Einzelne kortikale Neuronen können auf MEAs kultiviert und mittels Phasenkontrast-Mikroskopie visualisiert werden. Die einzelnen knopfartigen Punkte stellen jeweils eine individuelle Elektrode dar. Rechts: Beispielhafte Darstellung eines elektrischen Potenzials, welches mit einer MEA-Elektrode aufgenommen wurde. Die im Graph dargestellten Parameter werden für statistischen Analysen verwendet (Albrecht et al. Journal of Neuroinflammation 2012, 9:163).

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Jeder Elektrode ist ein einzelner Messkanal (Channel) zugeordnet. Die Rohdaten von allen 64 Messkanälen (Elektroden) wurden simultan mit einer Samplingfrequenz von 25 kHz abgetastet, visualisiert und unter Verwendung der Standardsoftware MC-Rack (Multi Channel Systems) gespeichert. Die Spike- und Burst-Erkennung erfolgte offline mittels einer Spezialsoftware (Spanner 2.0, Result, Deutschland) (Steinbeck et al., 2011).

⁵ Multi-Elektroden-Arrays durchgeführt von Goebels N und Quasthoff K

3.2.11 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen und Diagrammerstellungen wurden mit der Software Prism (GraphPad) und einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) durchgeführt.

Der Mehrgruppenvergleich wurde mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA) und dem Bonferroni- oder dem Dunnett-Post-hoc-Test durchgeführt, der Zweigruppenvergleich erfolgt unter Verwendung des Student's t-Tests. Es wurden Signifikanzwerte von p < 0,05 ermittelt und als signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1 Zeit-, Konzentrations- und Nrf2-abhängige Wirkung von DMF

4.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von DMF

Eine Präinkubation mit 10 μM Dimethylfumarat für 24 Stunden, aber nicht mit Monomethylfumarat (MMF), schützte die primären Kortikalkulturen (Abbildung 8, links) und die hippocampalen HT22-Zellen (Abbildung 8, rechts) vor oxidativer Glutamat-Toxizität.

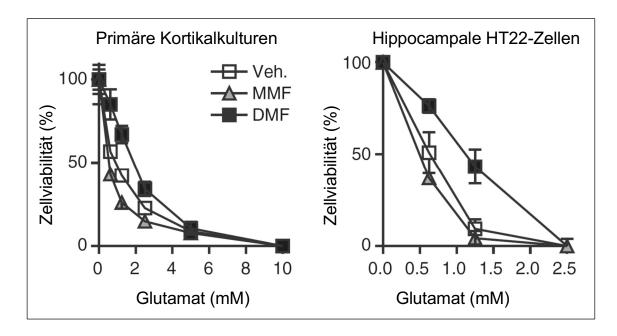


Abbildung 8: DMF schützt neuronale Zellen vor oxidativer Glutamat-Toxizität.

In einem Modell für endogenen, oxidativen Stress wurden primäre Kortikalkulturen (links) und hippocampale HT22-Zellen (rechts) mit Glutamat in verschiedenen Konzentrationen über das Zellkulturmedium behandelt. Vor der Glutamat-Exposition erfolgte eine Präinkubation beider Zellkulturen mit 10 µM DMF, MMF oder Vehikel für 24 Stunden. Die Glutamat-Inkubation erfolgte nachfolgend für 24 Stunden mit anschließender Messung der Zellviabilität mittels Cell Titer Blue Assay. 24-stündige Präinkubation mit DMF, aber nicht mit MMF, schütze die primären Kortikalkulturen und hippocampale HT22-Zellen vor oxidativer Glutamat-Toxizität. Statistische Auswertung mittels Two-Way-Varianz-Analyse (ANOVA) und Bonferroni Posthoc-Test zeigte für die Werte der Abbildung 8 einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: Dimethylfumarat (DMF), Monomethylfumarat (MMF), Vehikel (Veh).

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Die Behandlung sowohl mit 10 mM DMF als auch mit 10 µM MMF erhöht den zellulären Glutathionspiegel. Diese Wirkung ließ sich sowohl mit als auch ohne Zugabe von Glutamat beobachten (Abbildung 9).

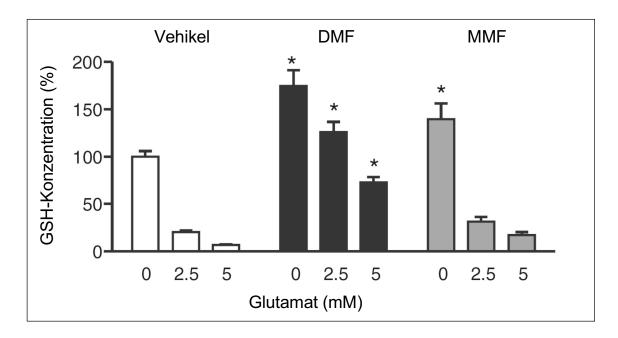


Abbildung 9: DMF und MMF erhöhen signifikant den zellulären Glutathion Spiegel in hippocampalen HT22-Zellen.

HT22-Zellen wurden mit 10 μM DMF, MMF oder Vehikel für 24 Stunden behandelt und nachfolgend für 8 Stunden mit den angegebenen Glutamat-Konzentrationen inkubiert. Im Anschluss erfolgte die enzymatische Messung der intrazellulären GSH-Konzentration. Erhöhte GSH-Spiegel zeigten sich in sowohl in Präsenz als auch in Abwesenheit von Glutamat. Die statistische Auswertung mittels Two-Way-Varianz-Analyse (ANOVA) und Bonferroni Posthoc-Test zeigte für die Werte der Abbildung 9 einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: Glutathion (GSH), Dimethylfumarat (DMF), Monomethylfumarat (MMF), Vehikel (Veh).

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Die neuroprotektive Wirkung von DMF war bei 24-stündiger Behandlung konzentrationsabhängig (Abbildung 10, links), die 24-stündige Behandlung mit MMF hingegen zeigte keinen neuroprotektiven Effekt (Abbildung 10, rechts).

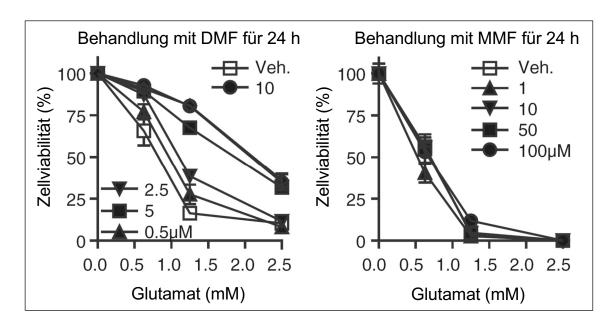


Abbildung 10: DMF wirkt konzentrationsabhängig protektiv auf die Zellviabilität.

Hippocampale HT22-Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen DMF, MMF oder Vehikel behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Glutamat und die enzymatische Messung der intrazellulären Glutathion-Konzentration. Der protektive Effekt zeigte sich konzentrationsabhängig für DMF, aber nicht für MMF. Abkürzungen: Dimethylfumarat (DMF), Monomethylfumarat (MMF), Vehikel (Veh)

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

4.1.2 Zeitabhängige Wirkung von DMF

Die neuroprotektive Wirkung von DMF erreichte bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit ihren Maximalwert (Abbildung 11, rechts). Verglichen mit DMF setzte die neuroprotektive Wirkung von MMF deutlich später ein und wurde erst nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden erkennbar (Abbildung 11, links).

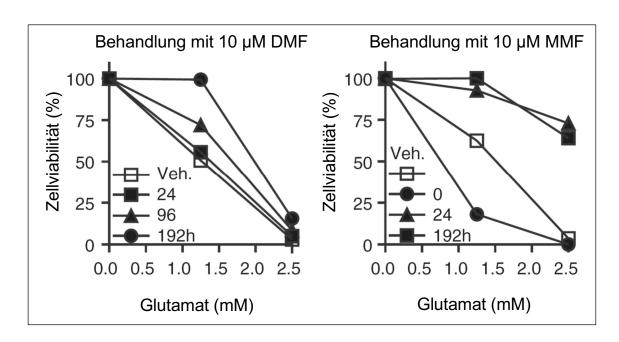


Abbildung 11: DMF wirkt schneller als MMF protektiv auf die Zellviabilität.

Hippocampale HT22-Zellen wurden 24 Stunden mit 10 µM DMF, MMF oder Vehikel behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Glutamat mit den angegebenen Konzentrationen und die enzymatische Messung der intrazellulären Glutathion-Konzentration. Der protektive Effekt von MMF zeigte sich zeitverzögert und war erst nach 96 Stunden evident, wohingegen DMF bereits nach 24 Stunden protektiv wirkte. Abkürzungen: Dimethylfumarat (DMF), Monomethylfumarat (MMF), Vehikel (Veh).

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Bei einer Zugabe von Glutamat und einer Behandlung mit DMF zeigte sich zunächst eine erhöhte Toxizität (Abbildung 11, rechts). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass DMF erst nach einer Stunde Exposition den zellulären GSH-Gehalt reduzierte (Abbildung 12).

Bei 24-stündiger Behandlung erhöhte DMF die GSH-Konzentration in HT22-Zellen. Bei kürzeren Behandlungszeiten senkte es das intrazelluläre GSH (Abbildung 12).

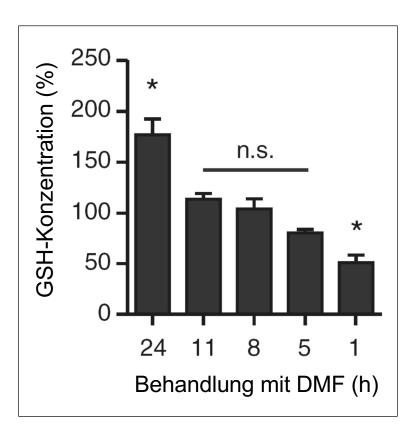


Abbildung 12: DMF reduziert den Glutathion-Gehalt in hippocampalen HT22-Zellen.

Hippocampale HT22-Zellen wurden für 1, 5, 8, 11 und 24 Stunden mit 10 μM DMF behandelt. Anschließend erfolgte die enzymatische Messung der intrazellulären GSH-Konzentration über den Zeitverlauf. Die signifikante Reduktion des intrazellulären GSH-Gehaltes zeigte sich nach 1 Stunde Exposition mit 10 μM DMF. Die statistische Auswertung mittels Two-Way-Varianz-Analyse (ANOVA) und Bonferroni Posthoc-Test zeigte für die Werte der Abbildung 12 einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: Dimethylfumarat (DMF), Glutathion (GSH), nicht signifikant (n.s.) .

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

4.1.3 Nrf2-abhängige Wirkung von DMF

Eine der wichtigsten Schutzmechanismen der Zellen vor oxidativem Stress besteht im Transkriptionsfaktor Nrf2 (Nguyen et al., 2003).

Für die Untersuchung der nukleären Translokation von Nrf2 wurden HT22-Zellen mit Vehikel (n=9.561 Zellen) oder mit 10 μM DMF für 24 Stunden (n=8.170 Zellen) sowie mit 25 μM TBHQ (n=3.281 Zellen) als Positivkontrolle über einen Zeitraum von 4 Stunden behandelt.

DMF hatte dabei keinen Effekt auf die GSH-Konzentration in embryonalen Fibroblasten von NRF2-knockout Mäusen (Abbildung 13).

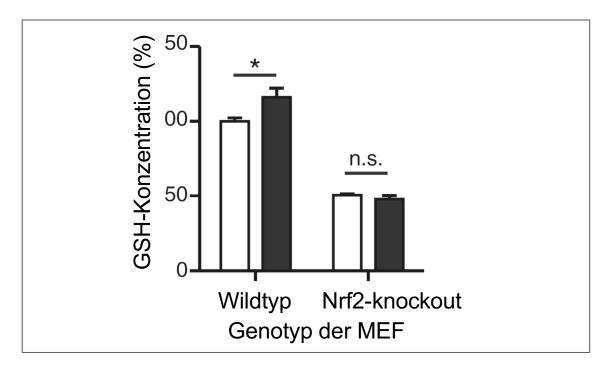


Abbildung 13: DMF zeigt keinen Einfluss auf Glutathion-Gehalt in Nrf2-defizienten Zellen. Embryonale Fibroblasten aus Wildtyp- und aus Nrf2-knockout Mäusen wurden 24 Stunden mit 10 µM DMF (schwarze Balken) oder Vehikel (weiße Balken) behandelt. Anschließend erfolgte die enzymatische Messung der intrazellulären GSH-Konzentration. Zellen ohne Nrf2 zeigten nach DMF-Exposition keine Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes. Die statistische Auswertung mittels Student's t-Test für verbundene Stichproben zeigte für die Werte der Abbildung 13 einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: Glutathion (GSH), murine embryonale Fibroblasten (MEF), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), nicht signifikant (n.s.) .

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Alle Grafiken des Kapitels 4.1 resultieren aus der Auswertung von Mittelwerten drei unabhängiger Experimente und geben den Standardfehler +SEM oder ± SEM an.

4.2 Protektive Wirkung von DMF und die effiziente Glutathion-Wiederverwertung

DMF erhöhte in HT22-Zellen die mRNA-Expression verschiedener Gene, die an der antioxidativen Reaktion beteiligt sind, darunter die Enzyme Glutamat-cysteinligase (GCLC), NQO1, Peroxiredoxin 1 sowie der Untereinheit xCT.

Daneben zeigte sich eine reduzierte Expression der Glutathion-S-Transferase 1 (GST1) sowie der Hämoxygenase 1 (HO1) (Abbildung 16, oben). In kortikalen Primärkulturen konnte durch DMF-Behandlung lediglich eine Induktion von xCT und NQO1 beobachtet werden (Abbildung 14, unten).

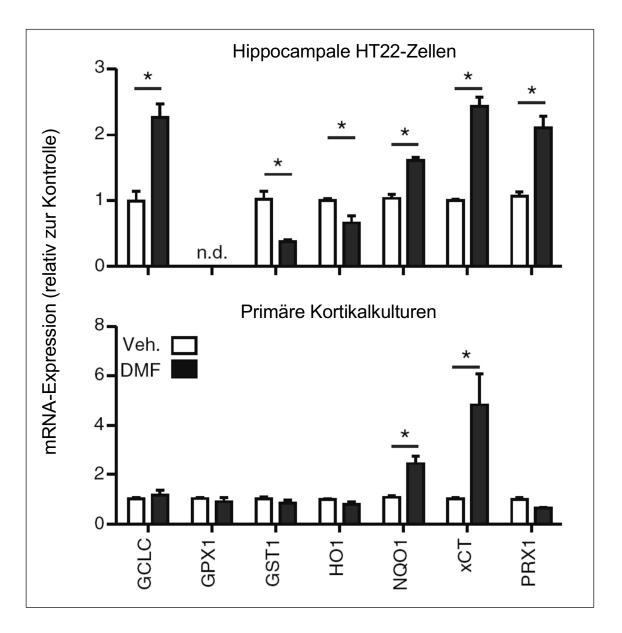


Abbildung 14: DMF induziert die mRNA-Expression von NRF2-abhängigen antioxidativen Genen. Hippocampale HT22-Zellen und primäre Kortikalkulturen wurden 24 Stunden mit 10 μM DMF oder Vehikel inkubiert. Die mRNA-Expression (Angabe relativ zur Kontrolle) wurde quantitativ mittels real-time PCR erhoben. β-Aktin und HPRT fungierten als endogene Kontrollgene. Im Vergleich zum Vehikel induzierte DMF-Behandlung die mRNA Expression von Transkripten, die bei der zellulären, antioxidativen Antwort relevant sind. Abbildung 14 zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und gibt den Standardfehler +SEM an. Die statistische Auswertung mit dem Student's t-Test für verbundene Stichproben zeigte einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: Dimethylfumarat (DMF), Vehikel (Veh), Glutamatcysteinligase (GCLC) Glutathion Peroxidase 1 (GPX1), Glutathion-S-Transferase 1 (GST1), Hämoxygenase 1 (HO1), NADPH-Chinon-Oxidoreduktase-1 (NQO1), funktionelle Untereinheit des Glutamat-Zystin-Antiporters (xCT), Peroxiredoxin (PRX1), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Anschließend wurde untersucht, ob die funktionale Hemmung der am stärksten induzierten Transkripte xCT sowie GCLC die protektive Wirkung von DMF aufhebt. Dabei wurden (S)-4-CPG und Buthioninsulfoximin (BSO) als Inhibitoren eingesetzt. Experimentell zeigte sich nachfolgend, dass DMF weiterhin eine protektive Funktion gegen beide Verbindungen aufrechterhalten konnte (Abbildung 15).

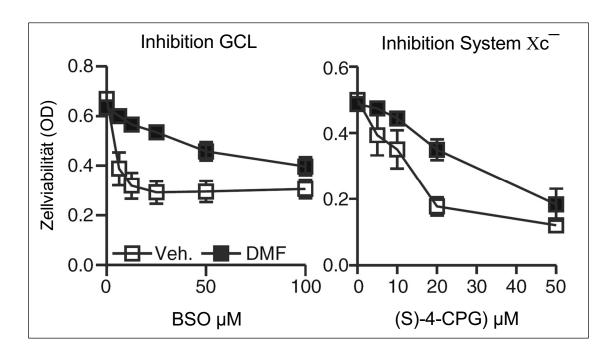


Abbildung 15: DMF wirkt auch bei Inhibition der de novo Synthese von Glutathion protektiv.

Hippocampale HT22-Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 µM DMF oder Vehikel inkubiert. Anschließend erfolgte die Exposition mit (S)-4-CPG) bzw. BSO mit den angegebenen Konzentrationen für weitere 24 Stunden. Das Zellüberleben wurde mittels Cell Titer Blue Assay anhand der optischen Dichte bestimmt. DMF zeigte einen protektiven Effekt auch bei Inhibition von GCLC durch BSO (links) bzw. Inhibition des System Xc durch (S)-4-CPG (rechts). Abbildung 15 zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und gibt den Standardfehler ± SEM an. Die statistische Auswertung mit dem Student's t-Test für verbundene Stichproben zeigte einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: Dimethylfumarat (DMF), Vehikel (Veh), Optische Dichte (OD), Glutamatcysteinligase (GCL), Buthioninsulfoximin (BSO), (S)-4-Carboxyphenylglycin ((S)-4-CPG).

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

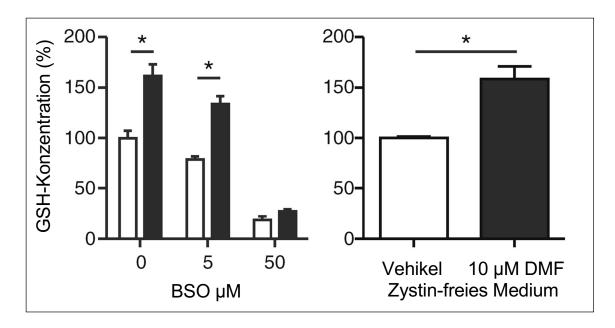


Abbildung 16: DMF erhöht zelluläre GSH-Spiegel auch bei Inhibition der Glutathion-Synthese. Hippocampale HT22-Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 µM DMF (schwarze Balken) oder Vehikel (weiße Balken) inkubiert. Anschließend erfolgte die Exposition mit BSO in den angegebenen Konzentrationen oder mit Zystin-freiem Medium für weitere 24 Stunden. Im Anschluss wurde die intrazelluläre Glutathion-Konzentration mittels enzymatischer Messung bestimmt. Die zelleigene Glutathion-Synthese wurde so auf zwei Wegen unterbunden: BSO inhibiert die Glutamat-Zystin-Ligase und Inkubation in Zystin-freiem Medium führt zur Depletion des intrazellulären Zystins. In beiden Fällen führte die Zugabe von DMF trotzdem zu Erhöhung der intrazellulären GSH-Spiegel. Abbildung 16 zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und gibt den Standardfehler +SEM an. Die statistische Auswertung mit dem Student's t-Test für verbundene Stichproben zeigte einen Signifikanzwert von *P<0,05.

Abkürzungen: Glutathion (GSH), Dimethylfumarat (DMF), Vehikel (Veh), Buthioninsulfoximin (BSO).

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

DMF war auch in der Lage den Glutathion-Spiegel signifikant zu erhöhen, wenn die GSH-Synthese durch Hemmung der Glutamat-Zystin-Ligase mittels BSO (Abbildung 16, links) oder durch Inkubation in Zystin-freiem Medium aufgehoben wurde (Abbildung 16, rechts). DMF konnte also noch eine protektive Wirkung in neuronalen Zellen vermitteln, wenn die *de novo* Glutathion-Synthese blockiert wird.

4.3 Einfluss der protektiven Konzentrationen von DMF auf die Zytokinproduktion in aktivierten Splenozyten

Nachfolgend wurde die Wirkung der neuroprotektiven DMF-Konzentrationen auf die Zellviabilität sowie auf das Profil von Splenozyten-sezernierten Zytokinen nach 24-stündiger DMF-Behandlung untersucht. Dazu wurden primäre Splenozyten aus C57BL/6- und SJL-Mäusen verwendet, die zuvor durch anti-CD3 stimuliert wurden. Die Messung der Apoptose und Nekrose erfolgte mittels FACScan Durchflußzytometer unter Verwendung von Annexin V- und 7-AAD-Färbung (7-Amino-Actinomycin).

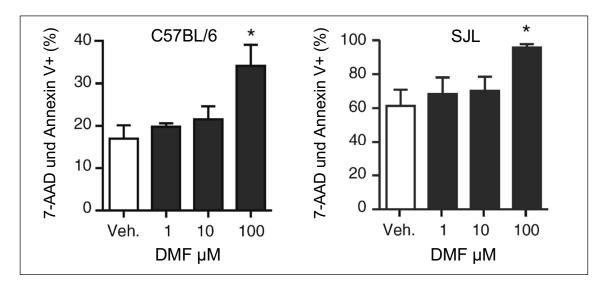


Abbildung 17: DMF in neuroprotektiven Konzentrationen wirkt nicht-toxisch auf primäre Splenozyten.

Inkubation von aktivierten Splenozyten aus C57BL/6- (links) und SJL-Mäusen (rechts) mit DMF für 24 Stunden in neuroprotektiven Konzentrationen von 1 µM bzw. 10 µM wirkte sich nicht negativ auf die Zellviabilität aus, während die Exposition mit 100 µM zum Zelltod / Apoptose führte. Die Zellviabilität wurde quantitativ mittels Durchflusszytometrie mit Apoptosemarker 7-AAD und Zelltodmarker Annexin V bestimmt. Abbildung 17 zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und gibt den Standardfehler +SEM an. Die statistische Auswertung zeigte mittels Two-Way-Varianz-Analyse (ANOVA) und Bonferroni Posthoc-Test für die Werte der Abbildung 17 einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) Dimethylfumarat (DMF), Vehikel (Veh) .

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Während eine Konzentration von 100 µM DMF die Anzahl nekrotischer und apoptotischer Splenozyten aus C57BL/6- und SJL-Mäusen signifikant erhöhte, ergaben sich bei beiden Mausstämmen keine signifikanten Unterschiede auf die Zellviabilität durch eine Behandlung mit 10 µM DMF bzw. der Vehikelkontrolle DMSO (Abbildung 17, links C57BL/6-Mäuse und Abbildung 17, rechts SJL-Mäuse).

Dieses vorangehende Experiment wies darauf hin, dass neuroprotektiv-wirksame DMF-Konzentrationen keinen negativen Effekt auf die Zellviabilität primärer Splenozyten zu haben scheinen.

4.4 Nur DMF-behandelte neuronale Zellen, nicht aber Splenozyten, führen durch Glutathion-Sekretion zur Erhöhung der extrazellulären Glutathion-Konzentration

Ziel der Untersuchungen war es zu ermitteln, welchen Effekt DMF auf die Interaktion zwischen neuronalen HT22-Zellen und murinen Splenozyten hat. Dazu wurden Präkonditionierungs-Experimente durchgeführt, bei denen die Wirkung des Überstandes aus DMF-vorbehandelten Zellkulturen analysiert wurde. Hierbei beobachten wir, dass es sowohl in HT22-Zellen als auch in Splenozyten, die mit 10 μM DMF für 24 Stunden präkonditioniert wurden, in gleichen Maßen zu einer Erhöhung des intrazellulären Glutathion-Gehaltes kam. Jedoch setzten nur HT22-Zellen, nicht aber Splenozyten, Glutathion auch extrazellulär frei. Dieses

Resultat deutet auf Unterschiede und eine differentielle Regulation in der Glutathion-Ausschüttung bzw. -Wiederverwertung von HT22-Zellen bzw. Splenozyten hin (Abbildung 23).

Nachfolgend wurde untersucht, ob diese DMF-vermittelten Veränderungen des Glutathion-Gehaltes und die Viabilität neuronaler Zellen auch die Viabilität von Splenozyten oder umgekehrt beeinflussen. Dazu wurden HT22-Zellen und murine Splenozyten für 24 Stunden mit 10 µM DMF bzw. Vehikel behandelt. DMF wurde nachfolgend aus dem Medium entfernt und die Zellen für weitere 24 Stunden in einem DMF-freien Medium inkubiert, um eine Akkumulation des sezernierten Glutathions bzw. anderen, durch DMF induzierte sekretierte Substanzen, zu ermöglichen. Anschließend wurde das so gewonnene präkonditionierte Medium auf unbehandelte Zellen übertragen und diese darin für weitere 24 Stunden inkubiert.

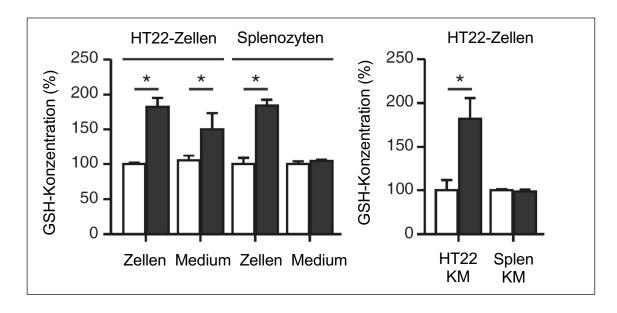


Abbildung 18: DMF-behandelte HT22 sekretieren neuroprotektives GSH nach Zystin-Depletion. Links: Hippocampale HT22-Zellen und primäre Splenozyten wurden für 24 Stunden mit 10 µM DMF (schwarze Balken) oder Vehikel (weiße Balken) präinkubiert Der intrazelluläre GSH-Gehalt wurde mittels enzymatischer Messung bestimmt und auf den zellulären Proteingehalt sowie auf Vehikel-behandelte Zellen normalisiert. Danach erfolgte eine 4-stündige Inkubation in Zystinfreiem Medium mit anschließender 24-stündiger Inkubation in Medium mit 10 µM DMF (schwarze Balken) bzw. Vehikel (weiße Balken). Freigesetztes (extrazelluläres) GSH wurde nachfolgend quantifiziert. HT22-Zellen und primäre Splenozyten zeigten nach 24-stündiger Präinkubation mit 10 µM DMF zunächst einen erhöhten intrazellulären GSH-Gehalt, aber nur HT22-Zellen

sekretierten GSH in neuroprotektiven Konzentrationen in das Medium. Rechts: Hippocampale HT22-Zellen, die mit präkonditioniertem Medium aus HT22-Kulturen behandelt wurden, nehmen das im Medium enthaltene GSH auf. Primäre Splenozyten zeigten dagegen keine Aufnahme von GSH aus konditioniertem Medium (KM). Abbildung 18 zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und gibt den Standardfehler +SEM an. Die statistische Auswertung mit dem Student's t-Test für verbundene Stichproben zeigte für die Werte der Abbildung 18 einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: Glutathion (GSH), Dimethylfumarat (DMF), Vehikel (Veh), konditioniertes Medium (CM).

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass HT22-Zellen, die im durch DMF-Vorbehandlung präkonditionierten Medium kultiviert wurden, in der Lage sind, Glutathion aufzunehmen und einen signifikant höheren intrazellulären Glutathion-Gehalt aufwiesen. Entsprechend im präkonditionierten Medium kultivierte Splenozyten zeigten hingegen keinen erhöhten GSH-Gehalt (Abbildung 18, rechts).

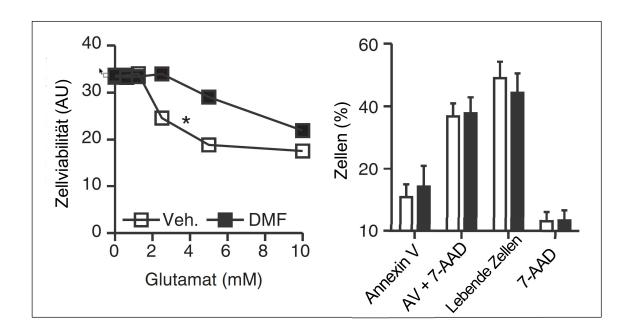


Abbildung 19: GSH aus präkonditioniertem Medium wirkt protektiv gegen Glutamat-Toxizität in HT22-Zellen und Splenozyten.

Hippocampale HT22-Zellen wurden mit präkonditioniertem Medium von DMF-behandelten HT22-Kulturen inkubiert und anschließend für 24 Stunden verschiedenen Glutamat-Konzentrationen ausgesetzt. Das präkonditionierte Medium zeigte einen protektiven Effekt gegenüber der oxidativen Glutamat-Toxizität (links). Das gleiche präkonditionierte Medium hatte dabei keinen

Einfluss auf die Zellviabilität in unstimulierten Splenozyten, welche quantitativ mittels Durchflusszytometrie mit Zelltodmarker Annexin V, dem Apoptosemarker 7-AAD sowie lebenden Zellen bestimmt wurde. Abbildung 19 zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und gibt den Standardfehler ± bzw. + SEM an. Die statistische Auswertung mit dem Student's t-Test für verbundene Stichproben zeigte für die Werte der Abbildung 19 (links) und mit Two-Way-Varianz-Analyse (ANOVA) und Bonferroni Posthoc-Test für die Werte der Abbildung 19 (rechts) einen Signifikanzwert von *P<0,05. Abkürzungen: Dimethylfumarat (DMF), Vehikel (Veh), arbiträre Units (AU), Annexin V (AV), 7-Amino-Actinomycin (7-AAD).

Lizenz: https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/ (Creative Commons CC BY 2.0)

Weiterhin wurde der Einfluss des präkonditionierten Mediums auf das Zellüberleben untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich das mit DMF-vorbehandelte HT22-Zellen präkonditionierte Medium protektiv auf andere HT22-Zellen auswirkte (Abbildung 19, links), jedoch keinen Effekt auf das Überleben von unstimulierten Splenozyten hatte (Abbildung 19, rechts). In der vorliegenden Versuchsanordnung konnte dabei weder eine extrazelluläre Sekretion von Glutathion durch Splenozyten gemessen werden noch ein Benefit der Splenozyten durch das von neuronalen Zellen sekretierte Glutathion.

Dabei ist anzumerken, dass eine umgekehrte experimentelle Anordnung, d.h. ein mit DMF-vorbehandelte Splenozyten präkonditioniertes Medium auf HT22-Zellen zu übertragen nicht möglich war. Die Ursache lag hierbei in technischen Gründen, da der verwendete Zellviabilitäts-Assay nicht mit Splenozyten-Medium verwendbar ist.

5. Diskussion

Die vorliegende Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Wirkmechanismen von Dimethylfumarat (DMF) hinsichtlich der Neuroprotektion und Immunmodulation näher zu charakterisieren. Dabei sollten die neuroprotektiven Effekte von Dimethylfumarat sowie dessen Einfluss auf die Immunmodulation – insbesondere bezüglich konzentrationsabhängiger Wirkunterschiede – analysiert werden. Zudem wurde untersucht, wie Dimethylfumarat sich auf interzelluläre Wechselwirkungen zwischen neuronalen und Immunzellen auswirkt sowie die Auswirkung der Substanz auf neuronale Funktionen.

Eine der wichtigsten Erkenntnisse aus den vorliegenden Experimenten besteht darin, dass DMF neuronale Zellen bereits in niedrigen Konzentrationen durch eine Erhöhung des zellulären Glutathion (GSH)-Gehalts vor oxidativem Stress schützt (vgl. 4.2.).

In den durchgeführten Experimenten benötigte der zellprotektive Effekt durch DMF einer zeit- und konzentrationsabhängigen Wirkweise dabei weniger Zeit zur vollständigen Ausprägung als der durch Monomethylfumarat (MMF) induzierte Schutz vor oxidativer Glutamat-Toxizität (vgl. 4.1.1). Die Induktion der antioxidativen Stressantwort, die schließlich zur GSH-Synthese führt, scheint dabei die Reaktion der Zelle auf einen ersten und kurzzeitigen oxidativen Stress zu sein. Als Ursache könnte hier sein, dass DMF unmittelbar nach Zugabe zur Zellkultur den zellulären GSH-Gehalt reduziert.

DMF ist ein ungesättigter Carbonsäureester, welcher daher sehr wahrscheinlich zunächst das Glutathion bindet und es nachfolgend sequestriert (Ghoreschi et al., 2011).

Die Langzeiteffekte von DMF in neuronalen Zellen werden vermutlich über den Transkriptionsfaktor Nrf2 vermittelt. Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von sogenannten *antioxidant response elements* (ARE) in Promoterregionen protektiver Gene wie NQO1 (Linker et al., 2011) oder HO-1 (Lin et al., 2011). Die Aktivierung von Promotorregionen solcher

Gene führt letztlich zu einer intrazellulären Erhöhung des wichtigen Antioxidans GSH.

Andere untersuchte Mechanismen, wie die Hemmung der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB, waren im untersuchten Zelltyp nicht nachweisbar. Ferner wurde eine Erhöhung der Glutathion-Synthese in Nrf2-knockout-Zellen verhindert (vgl. 4.1.3).

Übereinstimmend mit diesem Resultat, zeigten Albrecht und Kollegen, dass eine Inkubation hippocampaler HT22-Zellen mit DMF bereits bei vergleichbar niedrigen Konzentrationen bis 10 µM die nukleäre Nrf2-Konzentration erhöht, ohne dabei Einfluss auf den Transkriptionsfaktor NF-κB zu nehmen (Albrecht et al., 2012). Eine weitere Studie berichtete eine mögliche Inhibition der nukleären Translokation von NF-κB als Ursache für die protektiven Langzeiteffekte von DNF (Ghoreschi et al., 2011). Diese Theorie ist jedoch möglicherweise weniger wahrscheinlich, da in Nrf2-knockout Zellen eine Erhöhung der Glutathion-Synthese verhindert wurde (Albrecht et al., 2012). Dies weist darauf hin, dass der in dieser Arbeit gezeigte protektive Effekt von DMF gegenüber oxidativen Stress vermutlich maßgeblich über den Nrf2-Glutathion-Signalweg vermittelt wird (Albrecht et al., 2012).

Auf der transkriptionellen Ebene war der am deutlichsten induzierte Transkriptionsfaktor in HT22-Zellen und kortikalen Primärkulturen xCT (vgl. 4.2). Diese funktionelle Untereinheit des Systems Xc ist maßgeblich in der zellulären Glutathion-Homöostase involviert (Albrecht et al., 2010).

Experimentell erhöhte DMF auch dann den Glutathion-Gehalt, wenn die Aktivität des Glutamat-Zystin-Antiporters System Xc pharmakologisch mittels BSO oder durch Inkubation in Zystein-freiem Medium inhibiert wurde (vgl. 4.2). Diese Beobachtung lässt auf ein effizientes Glutathion-Recycling schließen, wobei der genaue Mechanismus zum Zeitpunkt der Studie nicht bekannt war.

Ein weiterer Hinweis auf ein verbessertes Glutathion-Recycling liegt zudem darin, dass DMF bei blockierter *de novo* Glutathion-Synthese noch eine protektive Wirkung in neuronalen Zellen vermitteln konnte (vgl. 4.2). In einer Anschlussarbeit

konnte nachgewiesen werden, dass Dimethylfumarat das Glutathion-Recycling durch Hochregulierung der Glutathion-Reduktase induziert (Hoffmann C et al., 2017).

Im Kontext des immunologischen Effektes von DMF analysierten Albrecht und Kollegen den Effekt von DMF auf die Präsenz proinflammatorischer Zytokine in DMF-vorbehandelten, anti-CD3-stimulierten, primären Splenozyten von C57BL/6-und der immunologisch reaktiveren SJL-Mauslinie. Dabei zeigte sich keine Veränderung der Produktion von Interleukin-4 oder Interleukin-5, jedoch eine signifikante Herabregulierung der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha, Interleukin-2 und Interleukin-17 in primären Splenozyten von C57BL/6-Mäusen (Albrecht et al. 2012). Stärker reagierten Splenozyten von SJL-Mäusen auf die DMF-Exposition. Hier fand sich eine Reduktion der Zytokine Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-6 und Interleukin-17 sowie von Interferon-gamma (Albrecht et al., 2012). DMF führte also in beiden Mauslinien zu einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine, was einen insgesamt anti-inflammatorischen Effekt vermittelt.

Dabei sollte berücksichtigt werden, dass in diesen Experimenten nur die unmittelbare Wirkung einer zeitlich relativ kurzen DMF-Behandlung und zwar in niedrigen Konzentrationen auf unsortierte Splenozyten, ohne Priming der Antigenpräsentierenden Zellen, untersucht wurde. Interessanterweise berichtet eine vorherige Studie, dass eine *in vitro* Behandlung mit 70 µM DMF die Produktion von IL-4 durch CD4+ T-Lymphozyten nur dann erhöhte, wenn eine Gegenwart von dendritischen Zellen bestand. Ein Priming ausschließlich mit anti-CD3/28 Antikörpern war hingegen nicht ausreichend, was auf die Notwendigkeit einer Präsenz Antigenpräsentierender Zellen für die TH2-vermittelte Immunantwort hinweist (de Jong et al., 1996; Ghoreschi et al., 2011).

Die hier vorliegenden Daten deuten zudem an, dass eine zusätzliche direkte Wirkung von DMF auf Splenozyten vorliegt, welche sich von der Wirkung beim Priming einer T-Zellantwort unterscheidet.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde präkonditioniertes Medium verwendet, welches aus DMF-vorbehandelten HT22-Zellen gewonnen wurde (vgl. 4.4). Die Kultivierung von Zellen in diesem präkonditionierten Medium zeigte, dass sowohl primäre Splenozyten als auch neuronale Zellen ihren intrazellulären Glutathion-Gehalt nach DMF-Behandlung erhöhen. Allerdings konnte nur bei den neuronalen Zellen eine Freisetzung dieses Glutathions in den extrazellulären Raum beobachtet werden. Dieser Mechanismus dient möglicherweise dazu, umliegende neuronale Zellen vor oxidativem Stress zu schützen, da diese in der Lage sind, das Glutathion durch den Konzentrationsanstieg in der Umgebung aufzunehmen. Neuroprotektiv wirksame DMF-Konzentrationen könnten dabei eine relevante immunmodulatorische Wirkung haben, ohne sich negativ auf die Zellviabilität der Splenozyten auszuwirken. Dieser Zytokin-Release ist bei SJL-Mäusen, die gegenüber C57BL/6 über ein aktiveres Immunsystem verfügen, stärker ausgeprägt.

Das gleiche präkonditionierte Medium konnte unstimulierte Splenozyten jedoch nicht vor dem Zelltod schützen (vgl. 4.4). Diese Beobachtung impliziert möglicherweise, dass die Apoptose dieser Zellen nicht primär durch oxidativen Stress verursacht wird, bzw., dass diese Zellen nicht fähig sind, das freigesetzte Glutathion überhaupt aufzunehmen.

Interessant hierbei ist, dass trotz einer Erhöhung ihres intrazellulären Glutathion-Gehaltes, DMF-vorbehandelte Splenozyten kein Glutathion in den extrazellulären Raum freisetzten sowie, dass eine Kultivierung in diesem Zellkulturmedium nicht den Glutathion-Gehalt der Splenozyten erhöhte.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse damit darauf hin, dass sowohl neuronale HT22-Zellen als auch Splenozyten als Immunzellen in der Lage sein könnten, ihren intrazellulären Glutathion-Spiegel nach einer DMF-Behandlung zu erhöhen. (vgl. 4.4) Dabei waren allerdings nur die neuronalen Zellen in der Lage dieses Glutathion auch in den extrazellulären Raum zu sekretieren, nicht aber die untersuchten Splenozyten. Möglicherweise dient dies als Schutzfunktion für umliegende neuronale Zellen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen mutmaßen, dass Splenozyten im Gegensatz zu HT22-Zellen, entweder kein Glutathion ausschütten, oder dieser Zelltyp möglicherweise einen erhöhten Bedarf aufweist und das freigesetzte Glutathion während der 4-stündigen Inkubation in Zystin-freiem Medium verbraucht. Eine weitere Möglichkeit könnte im grundsätzlichen Mangel eines Recycling-Mechanismus für Glutathion in Splenozyten liegen.

Experimente auf Multi-Elektroden-Arrays (MEAs) zeigten, dass die Behandlung mit 10 oder 100 µM DMF keinen Effekt auf die neuronale Aktivität von primären kortikalen Neuronen hat, die auf diesen MEAs kultiviert wurden (Albrecht et al., 2012). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch hohe DMF-Konzentrationen *in vitro* keine direkten Auswirkungen auf die neuronale Netzwerkaktivität von kortikalen Kulturen auf MEAs haben.

Zusammenfassend zeigen die Resultate dieser Studie, dass DMF bereits in niedrigen Konzentrationen von 10 µM protektive Effekte auf neuronale Zellen vermittelt, in dem es das Zellüberleben positiv beeinflusst und den endogenen, oxidativen Stress reduziert. Übereinstimmend mit unseren Erkenntnissen konnten andere Studien zeigen, dass DMF daneben die zur Reduktion der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, Interleukin-2 und Interleukin-17 führt und somit entzündlichen Vorgängen entgegenwirkt. (Albrecht et al., 2012). Wir glauben, dass diese Kombination aus immunmodulatorischen und neuroprotektiven Mechanismen relevant sind für das bessere Verständnis der pharmakologischen Wirkweise von DMF und dessen aktiven Metaboliten MMF in der Behandlung der Multiplen Sklerose.

6. Literaturverzeichnis

- Albrecht P, Lewerenz J, Dittmer S, Noack R, Maher P, Methner A: Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cysteine antiporter system xc- as a neuroprotective drug target. CNS Neurol Disord Drug Targets 2010, 9:373–382.
- Albrecht P, Bouchachia I, Zimmermann C, Hofstetter H, Kovacs Z, Henke N, Lisak D, Issberner A, Lewerenz J, Maher P, Goebels N, Quasthoff K, Mausberg A.K, Hartung H.P, Methner A.: Effects of dimethylfumarate on neuroprotection and immunomodulation. *Journal of Neuroinflammation* 2012, 9:163
- 3. Brück W, Stadelmann C (2003): Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 24 Suppl 5, 265-267
- 4. Charcot JM (1868): **Histologie de la sclérose en plaques**. *Gazette des Hôpitaux Paris* 141, 554-8
- 5. Choi, D. W. (1988). **Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system**. *Neuron*, 1, 623-634.
- Compston A, Coles A: Multiple sclerosis. Lancet 2008, 372:1502–1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- de Jong R, Bezemer AC, Zomerdijk TP, van de Pouw-Kraan T, Ottenhoff TH, Nibbering PH: Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. Eur J Immunol 1996, 26:2067–2074. doi:10.1002/eji.1830260916.
- 8. Dyment, D.A., G.C. Ebers, and A.D. Sadovnick. 2004a. **Genetics of multiple sclerosis**. *Lancet Neurol* 3:104-110.

- 9. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000 Nov 9;408(6809):239-47. Review
- Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT, Viglietta V, Dawson KT; CONFIRM Study Investigators. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. N Engl J Med. 2012 Sep 20;367(12):1087-97.
- 11. Fridlyand L.E. and Philipson L.H. (2005): Oxidative reactive species in cell injury: mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1066, 136–151.
- 12. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, Hussain RZ, Gocke AR, Respa A, Glocova I, Valtcheva N, Alexander E, Feil S, Feil R, Schulze-Osthoff K, Rupec RA, Lovett-Racke AE, Dringen R, Racke MK, Röcken M: Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med* 2011, 208:2291–2303. doi:10.1084/jem.20100977.
- Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI, Dawson KT; DEFINE Study Investigators. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med. 2012 Sep 20;367(12):1098-107.
- 14. Gonsette RE: **Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity**. *J Neurol Sci* 2008, **274**:48–53. doi:10.1016/j.jns.2008.06.029.
- 15. Gramowski A, Jügelt K, Stüwe S, Schulze R, McGregor GP, Wartenberg-Demand A, Loock J, Schröder O, Weiss DG: Functional screening of traditional antidepressants with primary cortical neuronal networks

- **grown on multielectrode neurochips**. *Eur J Neurosci* 2006, **24**:455–465. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04892.x.
- 16. Hafler DA (2004): **Multiple sclerosis.** *J Clin Invest* 113(6), 788-794
- 17. He X, Lin GX, Chen MG, Zhang JX, Ma Q: Protection against chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis by Nrf2. Recruiting Nrf2 into the nucleus and disrupting the nuclear Nrf2/Keap1 association. *Toxicol Sci* 98:298-309 (2007).
- Hoffmann C., Dietrich M., Herrmann A. K., Schacht T., Albrecht P, Methner A. (2017). Dimethyl fumarate induces glutathione recycling by upregulation of glutathione reductase. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017.
- 19. Hofstetter HH, Lühder F, Toyka KV, Gold R: **IL-17 production by** thymocytes upon CD3 stimulation and costimulation with microbial factors. *Cytokine* 2006, **34**:184–197. doi:10.1016/j.cyto.2006.04.014.
- 20. Huhn K, Linker R A., Erlangen; Fumaric acid a new option in oral therapy of multiple sclerosis; *Arzneimitteltherapie* 2014; **32**: 46–55
- 21. Jaiswal AK **Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression.** Free Radic Biol Med. 2004 May 15;36(10):1199-207.
- 22. Kappos L, Gold R, Miller DH, MacManus DG, Havrdova E, Limmroth V, Polman CH, Schmierer K, Yoursry TA, Yang M, Eraksoy M, Meluzinova E, Rektor I, Dawson KT, Sandrock AW, O'Neill GN, bg-12 Phase IIb Study Investigators: Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. Lancet 2008, 372:1463–1472. doi:10.1016/S0140-6736(08)61619-0.

- 23. Leutner S., Eckert, A. & Muller, W. E. (2001): **ROS generation, lipid** peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J. Neural Transm.* 108, 955.
- Lewerenz, J. und Methner, A. (2006). Mechanismen und Bedeutung der oxidativen Glutamattoxizität. In: Perspektiven der Hirnforschung, Neuro Forum, Organ der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, September 2006, e-Neuroforum, 12(3), 222-227. https://doi.org/10.1515/nf-2006-0303
- 25. Lewerenz J, Albrecht P, Tien M-LT, Henke N, Karumbayaram S, Kornblum HI, Wiedau-Pazos M, Schubert D, Maher P, Methner A: Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro. J Neurochem 2009, 111:332–343. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06347.x.
- 26. Lin, M T, Beal M F: **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases**; Nature, 443 (2006), pp. 787–795.
- 27. Lin SX, Lisi L, Russo Dello C, Polak PE, Sharp A, Weinberg G, Kalinin S, Feinstein DL: **The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1**. *ASN Neuro* 2011, **3**:75–84. doi:10.1042/AN20100033.
- 28. Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, Zeng W, Hronowsky X, Buko A, Chollate S, Ellrichmann G, Brück W, Dawson K, Goelz S, Wiese S, Scannevin RH, Lukashev M, Gold R: Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 2011, 134:678–692. doi:10.1093/brain/awq386.
- 29. Loewe R, Holnthoner W, Gröger M, Pillinger M, Gruber F, Mechtcheriakova D, Hofer E, Wolff K, Petzelbauer P: Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 2002, 168:4781–4787.

- Lublin FD, Reingold SC: Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology. 1996;46(4):907–11. PMID 8780061
- 31. Madamanchi N R, Runge M S: **Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis**; *Circ. Res., 100 (2007)*, pp. 460–47.
- 32. Maher, P. (2005). **The effects of stress and aging on glutathione metabolism**. *Ageing Res Rev*, 4, 288-314.
- 33. Martindale JL, Holbrook NJ: **Cellular response to oxidative stress:** signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002 Jul;192(1):1-15.
- 34. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW: Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. Proc Natl Acad Sci U S A 91:9926-9930 (1994).
- 35. Mrowietz U, Asadullah K, 2005. **Dimethylfumarate for psoriasis: more than a dietary curiosity**. *Trends Mol. Med.* 11, 43–48.
- 36. Nave K-A, Trapp BD: **Axon-glial signaling and the glial support of axon function**. *Annu Rev Neurosci* 2008, **31**:535–561. doi:10.1146/annurev. neuro.30.051606.094309.
- 37. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharma-col Toxicol* 43: 233-260.
- 38. Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and

- **multiple sclerosis.** Nat Med. 2011 Apr;17(4):495-9. doi: 10.1038/nm.2324. Epub 2011 Mar 27.
- 39. Schweckendiek W: **Treatment of psoriasis vulgaris**. *Med Monatsschr*, 1959;13(2): p. 103-4.
- 40. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. **Glutathione, oxidative** stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 2000 Aug;267(16):4904-11.
- 41. Siems, W.G., Krämer, K., Grune, T., **Zur Chemie und Biologie des Glutathionsystems: ein Überblick**. *Pharm. Ztg. 141 (1996)* 4239-4248.
- 42. Sospedra M, Martin R (2005): **Immunology of multiple sclerosis**. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747.
- 43. Steinbeck JA, Henke N, Opatz J, Gruszczynska-Biegala J, Schneider L, Theiss S, Hamacher N, Steinfarz B, Golz S, Brüstle O, Kuznicki J, Methner A: Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. Exp Neurol 2011, 232:185–194. doi:10.1016/j.expneurol.2011.08.022.
- 44. Trapp BD and Nave KA Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? Annu. Rev. Neurosci. 2008. 31:247–69 https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313
- 45. Zhang DD: **Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway**. *Drug Metab* Rev 38:769-789 (2006).

7. Publikationsliste

Veröffentlichungen mit Peer-Review-Verfahren:

Albrecht P, **Bouchachia I**, Zimmermann C, Hofstetter H, Kovacs Z, Henke N, Lisak D, Issberner A, Lewerenz J, Maher P, Goebels N, Quasthoff K, Mausberg A.K, Hartung H.P, Methner A. Effects of dimethylfumarate on neuroprotection and immunomodulation. *Journal of neuroinflammation*, 2012, 9. Jg., Nr. 1, S. 163.

Albrecht P, Henke N, Tien ML, Issberner A, **Bouchachia I**, Maher P, Lewerenz J, Methner A. Extracellular cyclic GMP and its derivatives GMP and guanosine protect from oxidative glutamate toxicity. *Neurochemistry international*, 2013, 62. Jg., Nr. 5, S. 610-619.

Henke N, Albrecht P, **Bouchachia I**, Ryazantseva M, Knoll K, Lewerenz J, Kaznacheyeva E, Maher P, Methner A. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress. *Cell death & disease*, 2013, 4. Jg., Nr. 1, S. e470.

Kongressbeiträge/Posterpräsentationen:

Bouchachia I, Albrecht P, Zimmermann C, Hofstetter H, Kovacs Z, Henke N, Lisak D, Issberner A, Lewerenz J, Maher P, Goebels N, Quasthoff K, Mausberg A.K, Hartung H.P, Methner A. Effekte von Dimethylfumarat auf Neuroprotektion und Immunmodulation (P34). *86. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)*, 2013, Dresden; Abstract/Poster/Präsentation

Albrecht, P, **Bouchachia, I**, Issberner, A, Methner, A. Evaluation of the protective capacities of fingolimod (FTY720) in a cell culture model of endogenous oxidative stress. *MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL*, 2013, 19. Jg., Nr. 11, S. 471-471.

Albrecht P, **Bouchachia I**, Issberner A, Methner A. Evaluation und Charakterisierung der von Fingolimod (FTY720) vermittelten Neuroprotektion in einem Zellmodell des endogenen oxidativen Stresses (P30). *86. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)*, 2013, Dresden; Abstract/Poster Präsentation

Albrecht P, **Bouchachia I**, Methner A., Kovacs Z, Henke N, Zimmermann C, Hofstetter H, Hartung H.P. Dimethylfumarate Protects from Oxidative Stress by Increasing Glutathione (P02. 120). *Neurology*, 2012, 78. Jg., Nr. 1 Supplement, S. P02. 120-P02. 120.

Methner A., Albrecht P, **Bouchachia I**, Hartung H.P. Prolonged Incubation with Laquinimod Protects Hippocampal Cells from Oxidative Stress (P02. 110). *Neurology*, 2012, 78. Jg., Nr. 1 Supplement, S. P02. 110-P02. 110.

8. Danksagungen

Ich möchte mich bei allen denen bedanken, die mich mit Rat und Tat bei der Planung und Durchführung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Axel Methner und Herrn Prof. Dr. Phillipp Albrecht für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit und die Möglichkeit tiefgehende und praktische Erfahrungen in der wissenschaftlichen Arbeit zu sammeln. Herrn Prof. Dr. Phillipp Albrecht möchte ich insbesondere für die große Hilfsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge bei der Erstellung dieser Dissertation und für die zahlreichen Unterstützungen, die er mir bei der Einarbeitung in die experimentellen Arbeiten gewährt hat, danken.

Für die ausgiebige Unterstützung bei den Laboratoriumsarbeiten und die Einführung in die Untersuchungsmethoden möchte ich mich bei Frau Andrea Issberner ganz herzlich bedanken. Die außerordentlich freundliche Atmosphäre, die ich während unserer Zusammenarbeit genießen durfte, war für mich von großer Hilfe.