

**Aus dem Zentrum für Neurologie  
Neurologische Universitätsklinik Tübingen / Hertie Institut für  
klinische Hirnforschung  
Abteilung Allgemeine Neurologie  
Komm. Leiter: Professor Dr. A. Melms**

**Behandlung mit CDK5 Inhibitor bei der Myelin Oligo-  
dendrozyten Glykoprotein (MOG) induzierten  
experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis  
(EAE)**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Stephan Tobias Herlan  
aus  
Bad Friedrichshall  
2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. R. Weissert

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. H. Schlüsener

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungen

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Multiple Sklerose (MS).....	1
1.1.1 Klinischer Verlauf und Diagnose.....	1
1.1.2 Pathogenese.....	3
1.1.3 Therapie.....	9
1.2 Tiermodelle / Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) .....	11
1.3 Neurodegeneration in EAE und MS .....	13
1.4 Tauprotein.....	15
1.5 Cyclin abhängige Kinase 5 (CDK5) und ihre Regulation.....	18
1.6 Tauphosphorylierung, CDK5, p25/p35 und Calpain in ihrer Rolle .....	20
bei neurodegenerativen Erkrankungen .....	20
1.7 Tauphosphorylierung, CDK5, p25/p35, p29/p39, Calpain und ihre Rolle in der EAE.....	22
1.8 Ziel der Dissertation .....	24
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.1 Tierversuche .....	26
2.1.1 Mausstämme .....	26
2.1.2 Rattenstämme .....	26
2.1.3 Induktion der EAE (Experimentellen Autoimmunen Encephalitis).....	27
2.1.3.1 Herstellen eines Inokulums und Immunisierung der Mäuse .....	27
2.1.3.2 Herstellen eines Inokulums und Immunisierung der Ratten.....	27
2.1.4 Behandlungsschema der LEW.1N und LEW.1AV1-Ratten intraperitoneal (i.p.).....	28
2.1.5 Intrathekale (i.t.) Applikation von R-Roscovitine .....	28
2.1.6 Beurteilung des Krankheitsverlaufs.....	31
2.1.7 Vorbereitung der Ratten zum ELISPOT .....	31

2.1.8 Vorbereitung der Ratten zum Western Blot .....	31
2.1.9 Vorbereitung der Ratten zur Histologie und Immunhistochemie .....	32
2.2 Immunologische und Proteinchemische Methoden.....	32
2.2.1 ELISPOT.....	32
2.2.2 Proteinbestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	34
2.2.3 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.2.4 Coomassie-Färbung .....	35
2.2.5 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen (Western Blot).....	35
2.2.6 Dekoration der Western Blot Membranen mit Antikörpern.....	36
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	37
2.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	37
2.3.2 DNA- Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	37
2.3.3 Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen .	38
2.3.4 Agarose- Gelelektrophorese .....	38
2.3.5 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> (TOP10).....	39
2.3.6 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	39
2.3.8 Sequenzierung.....	40
2.3.9 CIP (CDK5 Inhibitor Protein) Expression in <i>E. coli</i> Bakterien.....	41
2.3.10 CIP(CDK5 Inhibitor Protein) Reinigung.....	42
2.4 Histologische Methoden.....	43
2.4.1 Histologische Färbungen .....	43
2.5 Reagenzien.....	44
2.6 Kits.....	46
2.7 Antikörper.....	47
2.7.1 Antikörper für Elispot.....	47
2.7.2 Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie .....	47
2.7.2.1 Anti Tau Antikörper.....	47
2.7.2.2 Sonstige Antikörper .....	47

2.8 Plasmide .....	48
2.9 Sequenzierprimer .....	48
2.10 Chirurgisches Material .....	49
2.11 Puffer und Medien .....	49
2.12 Materialien .....	52
2.13 Geräte .....	53
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
3.1 Induktion einer EAE in verschiedenen Rattenstämmen .....	54
3.1.1 Induktion einer EAE in LEW.1N Rattenstämmen .....	55
3.1.2 Induktion einer EAE in LEW.1AV1 Rattenstämmen .....	56
3.2 Nachweis von phosphoryliertem Tau, CDK5 und p35/p25 in der MOG- induzierten EAE bei den Rattenstämmen LEW.1N und LEW.1AV1 .....	58
3.2.1 Nachweis von phosphoryliertem Tau bei der MOG induzierten EAE bei LEW.1N Ratten .....	58
3.2.2 Nachweis von phosphoryliertem Tau bei der MOG induzierten EAE bei LEW.1AV1 Ratten .....	59
3.3. Behandlung bei der MOG induzierten EAE bei LEW.1N Ratten mit einem kommerziellen CDK5 Inhibitor (R-Roscovitine) durch intraperitoneale (i.p.) Applikation .....	62
3.3.1 Behandlung der LEW.1N Ratten durch intraperitoneale Applikation von R-Roscovitine in einem prophylaktischen Behandlungsregime .....	62
3.3.2. Behandlung der LEW.1N Ratten durch intraperitoneale Applikation von R-Roscovitine in einem therapeutischen Behandlungsregime .....	64
3.3.3 Nachweis von phosphoryliertem Tau nach der i.p. Behandlung mit R- Roscovitine bei LEW.1N .....	66
3.4. Behandlung MOG induzierter LEW.1N Ratten durch intrathekale (i.t.) Applikation von R-Roscovitine in einem therapeutischen Regime .....	68
3.5. Behandlung bei der MOG induzierten EAE bei LEW.1AV1 Ratten mit einem kommerziellen CDK5 Inhibitor (R-Roscovitine) durch intraperitoneale (i.p.) Applikation .....	72
3.5.1 . Behandlung der LEW.1AV1 Ratten durch intraperitoneale Applikation von R-Roscovitine in einem therapeutischen Regime .....	72

3.5.2. ELISPOT der verschiedenen Behandlungsgruppen der MOG induzierten LEW.1AV Ratten .....	74
3.5.3 Nachweis von phosphoryliertem Tau nach der i.p. Behandlung mit R-Roscovitine bei LEW.1AV1 .....	76
3.6. Klonierung, Sequenzierung, Induktion und Reinigung des CDK5 Inhibitor Proteins (CIP) .....	77
3.6.1 Restriktionsverdau und Sequenzierung der CIP Plasmide .....	77
3.6.2 IPTG Induktion des CDK5 Inhibitor Proteins .....	80
3.7. Behandlung von MOG induzierten LEW.1N Ratten mit dem CDK5 Inhibitor Protein durch intraperitoneale (i.p.) Applikation .....	82
3.7.1 Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau bei CIP behandelten LEW.1N Ratten .....	84
3.8. Behandlung von MOG-induzierten LEW.1AV1 Ratten mit dem CDK5 Inhibitor Protein durch intraperitoneale (i.p.) Applikation .....	85
3.8.1 Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau bei CIP behandelten LEW.1AV1 Ratten .....	87
3.9. Induktion einer EAE in Calpastatin (CAST - Tg) transgenen und Calpastatin knockout (CAST- KO) C57/Bl6 Mäusen .....	88
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>91</b>
4.1 Induktion einer EAE in verschiedenen Rattenstämmen und Untersuchung auf hyperphosphoryliertes Tau und das p35 Spaltprodukt p25 .....	91
4.2 Behandlung der MOG-induzierten EAE bei LEW.1N Ratten mit R-Roscovitine i.p. und i.t. ....	93
4.3 Behandlung der MOG-induzierten EAE bei LEW.1AV Ratten mit R-Roscovitine i.p. ....	96
4.4 Untersuchung auf hyperphosphoryliertes Tau und p35/25 nach der i.p. Behandlung mit R-Roscovitine bei LEW.1N und LEW.1AV1 .....	97
4.5 CIP Expression und Reinigung .....	99
4.6 Behandlung der MOG-induzierten EAE bei LEW.1N und LEW.1AV1 Ratten mit CIP i.p. ....	100
4.7 Untersuchung auf hyperphosphoryliertes Tau und p35/25 nach der i.p. Behandlung mit CIP bei LEW.1N und LEW.1AV1 .....	101

4.8 Induktion einer EAE bei Calpastatin Knockout (CAST-KO), bzw. Calpastatin transgenen (CAST-Tg) Mäusen .....	103
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>105</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>125</b>
7.1 Vektorkarte des pGEX-4T2 Vektors .....	125
7.1.1 Sequenz des pGEX-4T2 Vektors .....	125
7.2 Vektorkarte des pcDNA 3.1/ HIS C Vektors .....	127
7.2.1 Sequenz des pcDNA 3.1/ HIS C Vektors .....	128
7.3 CIP AS-Sequenz .....	129
7.4 Abbildungsverzeichnis .....	130
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>132</b>

### **Abkürzungen**

ANOVA	Analysis of Variance
APP	Amyloid Precursor Protein
APZ	Antigen Präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
AT	Anti Tau
AUC	Area under the Curve
BHS	Blut Hirn Schranke
CAST	Calpastatin
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin abhängige Kinase
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
CIP	CDK5 Inhibitor Protein
ConA	Convanavalin A
CSF	Cerebrospinal Fluid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
EBV	Eppstein-Barr Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Technique
HHV	Humanes Herpes Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
IE	Injektionseinheiten
IFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvans
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
i.t.	intrathekal

## Abkürzungen

---

i.v.	intravenös
KO	Knock-Out
LEW.	LEW Ratte
MAP	Microtubuli Assoziiertes Protein
MBP	Myelin Basisches Protein
MEF	Monocyte Enhancing Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl 1,2,3,6 Tetrahydropyridine
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
M.t.	Mycobakterium tuberculosis
NFT	Neurofibrillary Tangles
N., Nn.	Nervus, Nervi
PHF	Paired Helical Filament
PKA	Proteinkinase A
PLP	Proteolipoprotein
PML	Progressive Multifokale Leukencephalopathie
rrMOG	recombinant rat MOG
s.c.	subcutan
SD	Standard Deviation / Standardabweichung
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel Electrophoresis
SEM	Standard Error of the Mean / Standardfehler
SEP	Sensibel evozierte Potentiale
SF	Straight Filaments
Tg	transgen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZR	T-Zell Rezeptor
VCAM	Vascular Cell Adhaesion Molecule
VEP	Visuell evozierte Potentiale
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **1 Einleitung**

### **1.1 Multiple Sklerose (MS)**

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die mit einer Demyelinisierung der Nervenzellaxone einhergeht und weltweit über 2 Millionen Menschen betrifft. Aufgrund der hohen Prävalenz ist die MS die führende Ursache von nicht-traumatisch bedingten neurologischen Behinderungen. Obwohl die Erwähnung der Erkrankung bis ins Mittelalter zurückreicht, wurde die MS als definierte Erkrankung zum ersten Mal im 19. Jahrhundert beschrieben. Die erste offizielle Publikation mit Definition pathologischer Kriterien wurde 1868 in den „Leçons du Mardi“ von Jean-Martin Charcot, Professor für Neurologie an der Universität von Paris, veröffentlicht (Charcot, 1868). Bei der Untersuchung des Gehirns einer jungen Frau, konnte er charakteristische Narben erkennen, die er als „la sclérose en plaque“ beschrieb. Seine damals festgelegten Diagnosekriterien, wie z.B. Nystagmus, Intentionstremor und skandierende Sprache, werden auch heute noch zum klinischen Bild der Multiplen Sklerose gezählt.

In Deutschland sind ca. 120 000 Patienten betroffen, wobei Frauen mit einem Verhältnis von ca. 2:1 überwiegen. Es handelt sich um eine Erkrankung des jüngeren Erwachsenenalters mit Erkrankungsbeginn zwischen dem 20. – und dem 40. Lebensjahr und einem chronischen Erkrankungsverlauf.

#### **1.1.1 Klinischer Verlauf und Diagnose**

Der klinische Verlauf der MS lässt sich in verschiedene Subtypen unterteilen, von denen der primär schubförmige Verlauf (ca. 85%) der häufigste ist. Ein Schub wird dabei definiert als das akute Neuauftreten eines neurologischen Defizits mit anschließender vollständiger oder partieller Rückbildung der neurologischen Symptomatik. Dabei wechseln sich Phasen von akuten Schüben mit Phasen ohne neue Symptomatik ab. Innerhalb des chronischen Krankheitsverlaufes, entwickeln ca. 90 % der Patienten, einen sekundären progredienten Verlauf, was mit einem stetig ansteigenden Grad der neurologischen Behinderung ohne Rückbildung der Symptomatik einhergeht.

Ungefähr 10 % der Patienten leiden an einer primär progredienten Verlaufsform der Erkrankung, bei dem es von Beginn an zu einer kontinuierlichen Zunahme der neurologischen Defizite kommt. Weitere 5 % der Patienten leiden an einer schubförmig-progredienten Verlaufsform, bei der es zu einer ständigen Zunahme der neurologischen Behinderung mit zeitlich deutlich abgrenzbaren, aufgesetzten Schüben mit oder ohne Rückbildung der Symptomatik kommt.

Die Diagnose MS stützt sich unter anderem auf das klinische Bild, das eine große Heterogenität aufweist. Charakteristische Symptome für die Erkrankung sind das Auftreten der Erkrankung zwischen dem 15. und 50. Lebensjahr, eine Sehinderung oder Sehverschlechterung aufgrund einer Optikusneuritis, eine internukleäre Ophthalmoplegie, sowie ein schubförmiger Verlauf. Die Anamnese, die Krankheitsgeschichte und die klinische Untersuchung spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Diagnosestellung der MS. Die „zeitliche und räumliche Disseminierung“ dient als weiteres entscheidendes Kriterium zur Diagnosestellung. Zeitliche und räumliche Disseminierung bedeutet, dass die Krankheitssymptome entweder zu mindestens zwei verschiedenen Zeitpunkten, oder in mehr als zwei räumlich voneinander getrennten Teilen des ZNS auftreten müssen (Schumacher et al., 1965).

In den frühen 1980er Jahren wurden weitere Diagnosekriterien entwickelt, die sogenannten Poser-Kriterien (Poser et al., 1983), die neben dem klinischen Bild auch apparative und laborchemische Untersuchungen mit einbeziehen. Zu den genutzten Untersuchungsmethoden gehören unter anderem visuell- und sensorisch evozierte Potentiale (VEP's und SEP's), sowie der Nachweis von oligoklonalen Banden und die Bestimmung des IgG-Index im Liquor (CSF = cerebrospinal fluid).

Im Jahr 2001 erhielten die bildgebenden Methoden einen erhöhten Stellenwert zur Diagnosesicherung (McDonald et al., 2001). Diese McDonald Kriterien wurden im Jahr 2005 und 2011 erneut revidiert (Polman et al., 2005, Polman et al., 2011) und dienen in ihrer jetzigen Form als Standard der Diagnosestellung einer MS. Die Diagnose MS wird dann gestellt, wenn die Kombination aus klini-

schen und apparativen Befunden die Diagnose rechtfertigen und eine andere Ursache für die Erkrankung in Betracht gezogen und ausgeschlossen wurde.

### **1.1.2 Pathogenese**

Die genaue Ätiologie der Multiplen Sklerose ist trotz weltweiter Forschung und Anstrengungen noch immer unklar. Aktuelle Erkenntnisse weisen aber darauf hin, dass neben einer genetischen Prädisposition weitere Auslöser, wie verschiedene Umweltfaktoren oder Infektionen mit Viren eine Rolle spielen (Ebers, 2008). In diesem Zusammenhang werden beispielsweise das Epstein-Barr Virus (EBV) und das humane Herpes Virus 6 (HHV-6) diskutiert (Keegan und Noseworthy, 2002). Eine positive Serologie für EBV findet sich in fast allen MS-Patienten und weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine im Jugendalter erworbene infektiöse Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber), im Vgl. zu einer kindlich erworbenen EBV Infektion, das Risiko an einer MS zu erkranken um das bis zu 3fache erhöht (Thacker et al., 2006).

Dass genetische Faktoren eine Rolle für die Suszeptibilität der Erkrankung spielen wird schon seit über 30 Jahren diskutiert. Konkordanzraten von ca. 30 Prozent bei eineiigen Zwillingen verglichen mit ca. 5 Prozent bei zweieiigen Zwillingen geben starken Hinweis (Sadovnick et al., 1993); zusätzlich hierzu ist das absolute Risiko von erstgradigen Verwandten an einer MS zu erkranken weniger als 5 Prozent, dabei aber dennoch 20- 40 mal höher als das Risiko der Allgemeinbevölkerung (Sadovnick et al., 1988).

Bereits 1973 wurde eine Assoziation der MS mit der HLA-Spezifität HLA-Dw2 gefunden (Jersdil et al., 1973). In der Folge konnten Assoziationen mit Haplotypen aufgezeigt werden, die HLA-DR2, HLA-DR3 oder HLA-DR4 aufweisen (Olerup und Hillert 1991, Hillert und Olerup 1993). Da sich HLA-DR2 in Linkage Disequilibrium mit HLA-DQ6 befindet, werden diese Spezifitäten in HLA-Haplotypen, die bei Europäern und Amerikanern gefunden werden, immer zusammen vererbt. Ein serologischer Haplotyp HLA-Dw2 entspricht dabei genetisch HLADRB1\*1501, HLADRB5\*0101, HLADQB1\*0602. Deshalb wurde intensiv daran geforscht, welches in diesem Haplotyp enthaltene Allel für die Suszeptibilität für eine MS als Hauptrisikoallel verantwortlich sein könnte, wobei

eine Unterscheidung mit herkömmlichen genetischen Methoden sich zunächst als schwierig erwies (Miretti et al., 2005) und in unterschiedlichen Populationen und Studien sehr variable Ergebnisse erbrachte (Schmidt et al., 2007). Dennoch wurde für das Allel HLADRB1\*1501 eine häufigere unabhängige Assoziation mit der MS aufgezeigt, als bei den anderen Allelen (Corradu et al., 1998; Kwon et al., 1999; Oksenberg et al. 2004). Dennoch weisen die Studien darauf hin, dass HLADRB1\*1501 nicht als einziges Allel im HLA Komplex zur Erklärung der Suszeptibilität herangezogen werden kann (Dyment et al., 1994). Neueste weltweite Genom Assoziationsstudien an sehr großen Zahlen an Patienten zeigen eine HLA-Assoziation der MS mit HLA-DR2 mit  $p < 10^{-340}$  (Compston et al. in press). Im Weiteren wurden weltweite Studien durchgeführt um Kandidatengene außerhalb des HLA Locus zu identifizieren und es wurden mehrere 100 Kandidatengene publiziert, von denen lange Zeit keine Akzeptanz erreichte (Oksenberg und Barcellos, 2005; Oksenberg et al. 2008). Erst durch neuere Methodik und weltweiter Kooperation gelang es für andere Risiko Gene statistische Signifikanz zu erreichen. In jüngster Zeit wurden dadurch IL7R (Gregory et al., 2007), IL2R, CLEC16A und CD226 als Risiko Gene für die MS etabliert (Hafler et al., 2007, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), 2009). Interessanterweise spielen auch diese Gene, soweit bisher bekannt, eine Rolle im Immunsystem, z.B. kodieren IL2R und IL7R für die IL2-Rezeptoren bzw. die Alpha-Kette vom IL2-Rezeptor auf B- und T-Lymphozyten.

Allgemein ist man der Ansicht, dass die MS eine vom Immunsystem vermittelte Erkrankung ist, die bei genetisch empfänglichen Personen auftritt. Ein pathologisches Kennzeichen der MS ist der demyelinisierte Plaque, der sich histologisch durch den Verlust von Myelin, dem Untergang von Axonen, sowie der Bildung von Astrozyten Narben auszeichnet. Diese klassischen Läsionen haben Prädilektionsstellen am N. opticus, der periventrikulären weißen Substanz, sowie Fasertrakten des Hirnstamms und des Rückenmarks. In den Läsionen findet man verschiedene Infiltrate von Immunzellen, die meist perivaskulär liegen und sich je nach Aktivitätszustand der Läsion unterscheiden. In aktiven Plaques

findet man perivaskuläre Ansammlungen von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, Monozyten, sowie vereinzelt B-Lymphozyten und Plasmazellen. Makrophagen finden sich meist im Zentrum der Plaques und konnten schon mit inkorporierten Myelinbestandteilen beobachtet werden. In chronisch-aktiven Plaques findet sich insgesamt deutlich weniger entzündliches Infiltrat und die Zellverteilung ist auf die Ränder der Läsionen beschränkt.

Als ein entscheidender Faktor der Erkrankung gilt das Einwandern von autoreaktiven, myelinspezifischen T-Zellen in das Zentrale Nervensystem (ZNS). Diese Erkenntnisse stammen aus der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), dem klassischen Tiermodell der MS, bei dem durch Immunisierung mit myelinspezifischen Proteinen oder Peptiden, wie z.B. Myelin basischem Protein (MLP), oder Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG) eine Erkrankung ausgelöst werden kann. Diese Erkrankungen sind hauptsächlich durch CD4+ T-Lymphozyten verursacht. Im peripheren Blut und im CSF von MS Patienten konnte man autoreaktive myelinspezifische T-Zellen nachweisen, die eine höhere Aktivität als diejenigen gesunder Kontrollen zeigten (Lovett-Racke et al., 1998; Frohman et al., 2006). Diese erhöhte Aktivität resultiert in einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und damit besserer Interaktion mit der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Dadurch gelangen die CD4+ T-Lymphozyten in das ZNS und können hier eine entzündliche Reaktion vermitteln. Weshalb, bzw. wie diese myelinspezifischen CD4+ Zellen aktiviert werden, wird noch kontrovers diskutiert. Zu den möglichen Theorien zählt neben „Molekularem Mimicry“, bei dem spezifische T-Zellen gegen Fremdepitope (virale oder bakterielle Antigene) generiert werden und dann mit Myelinbestandteilen gleicher Sequenz kreuzreagieren (Wucherpfennig und Strominger, 1995; Münz et al., 2009), auch die Präsentation von Myelin Antigenen in Lymphknoten. Weiterhin könnten, neben einer verstärkten Bildung von autoreaktiven T-Zellen, auch deren verminderte Regulation, bzw. Störungen in peripherer und zentraler Toleranz ursächlich zur Krankheit beitragen. Nach passieren der BHS werden die autoreaktiven CD4+ Zellen im ZNS reaktiviert nachdem ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) bestimmte prozessierte Antigene von Mikroglia und lokalen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) an MHC Typ II präsentiert werden. Zu

diesen prozessierten Antigenen gehören auch Myelinbestandteile, wie z.B. Myelin-basisches Protein (MBP) oder Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG). Dieser Mechanismus bewirkt eine Aktivierung von CD4+Th1-Zellen, die über ein proinflammatorisches Zytokinprofil (z.B. Interferon  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL-2, IL-12) eine weitere Destruktion der BHS vermittelt und eine Chemotaxis mit Einwanderung weiterer Immunzellen in das ZNS ermöglichen. CD4+Th2-Zellen produzieren antiinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-4 und dienen hauptsächlich dem Abbau extrazellulärer Antigene (Mosmann et al., 1986). Deshalb wird eine Disbalance zwischen dem proinflammatorischen CD4+Th1 und dem antiinflammatorischen CD4+Th2 Subtyp zu den möglichen Ursachen einer MS gerechnet. Weitere T-Zell Populationen wie z.B. CD4+TH17 Zellen scheinen im Weiteren eine Bedeutung bei der Immunpathogenese der MS zu haben. Sie exprimieren die proinflammatorischen Zytokine IL-17A und IL-17 F (Korn et al., 2009) und in Tiermodellen der MS zeigte eine Reduktion der TH17 Population eine geringere Krankheitsausprägung als unbehandelte Tiere. Ein nach Th17 verschobenes Verhältnis von TH17 zu TH1 Zellen scheint eine vermehrte Einwanderung von T-Zellen ins ZNS und eine proinflammatorische Wirkung zu vermitteln (Strommes et al., 2008; Kebir et al., 2009). Erhöhte IL-17 Spiegel konnten im Blut, CSF und Gehirn von MS Patienten detektiert werden, und weiter zeigten sich bei MS Patienten im akuten Schub vermehrt TH17+ Zellen im CSF, so dass eine pathogene Rolle für diese Zellpopulation angenommen werden kann (Tzartos et al., 2008; Brucklacher-Waldert et al., 2009). Eine Rolle von T-Regulatorischen Zellen (CD4+CD25+ Treg) in der Pathogenese der MS wird diskutiert, da bei MS Patienten die Aktivierung autoreaktiver myelinspezifischer Th4+ Zellen in der Peripherie nicht ausreichend supprimiert wird (Tsaknaridis et al., 2003; Viglietta et al., 2004). Ob diese Zellen antiinflammatorische Wirkung im ZNS besitzen bleibt unklar. Während in Tiermodellen T<sub>reg</sub>-Zellen im ZNS nachzuweisen sind, aber unterschiedlichen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung zeigen, konnten CD4+CD25+ Zellen im ZNS von MS Patienten nicht nachgewiesen werden, was entweder auf einen mangelnde Suppression von Entzündungen, oder aber auf eine mangelnde Einwanderung ins ZNS hinweisen könnte (Korn et al., 2007). Eine wichtige Rolle in der Patho-

genese wird auch den CD8+ T-Zellen zugeschrieben, die in entzündlichen Infiltraten im ZNS und im CSF von MS Patienten nachgewiesen wurden (Babbe et al., 2000; Skulina et al., 2004). Die Anzahl der CD8+ Zellen zeigt eine direkte Beziehung zum Ausmaß der Axonzerstörung (Bitsch et al., 2000), weit mehr konnte auch gezeigt werden, dass CD8+ Zellen über MHC Klasse I direkt Dendriten und Axone angreifen und damit Neuronen zerstören können (Medana et al., 2001). Insgesamt führt eine Disbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren zur einer Destruktion von Myelinscheiden, Oligodendrozyten und in der Folge von Axonen. Diese Destruktion erfolgt über verschiedene immunologische Mechanismen, wie z.B. zytokin-vermittelte Zerstörung, antikörpervermittelte Phagozytose von Myelinscheiden durch Makrophagen, Komplementaktivierung und komplement-vermittelte Destruktion von Myelin, direkte Antikörpertoxizität gegen die Myelinoberfläche, sowie Zerstörung von Oligodendrozyten durch CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten (Noseworthy et al., 2000).

Der Abbau der Myelinscheiden führt zu einer Freilegung von Axonen, was durch den Zusammenbruch der axonalen Leitung und dem fehlenden Schutz vor weiteren schädigenden Einflüssen, wie Zytokinen, Chemokinen und Komplementfaktoren, in einer irreversiblen axonalen und neuronalen Schädigung und damit klinisch in einer anhaltenden neurologischen Behinderung resultiert (Hafler, 2004).

In jüngerer Zeit wird auch verstärkt der Einfluss von B-Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose diskutiert (Cross et al., 2001; Ziemssen und Ziemssen, 2005; Corcione et al., 2005). Dabei könnten den B-Zellen in vielen verschiedenen Phasen eine entscheidende Rolle zukommen, beginnend von der Autoantikörperproduktion, über eine weitere Aktivierung der T-Zellen, bis hin zu einer direkten Schädigung von Myelinscheiden und Oligodendrozyten durch B-Zell vermittelte Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6 oder Lymphotoxin. Eine B-Zell Depletion durch den Antikörper Rituximab konnte eine Reduktion von entzündlichen Läsionen und der Schubhäufigkeit bei der MS zeigen (Hauser et al., 2008). Über die Rolle von B-Zellen bei protektiven Mechanismen, wie z.B. der Remyelinisierung wird noch kontrovers diskutiert.

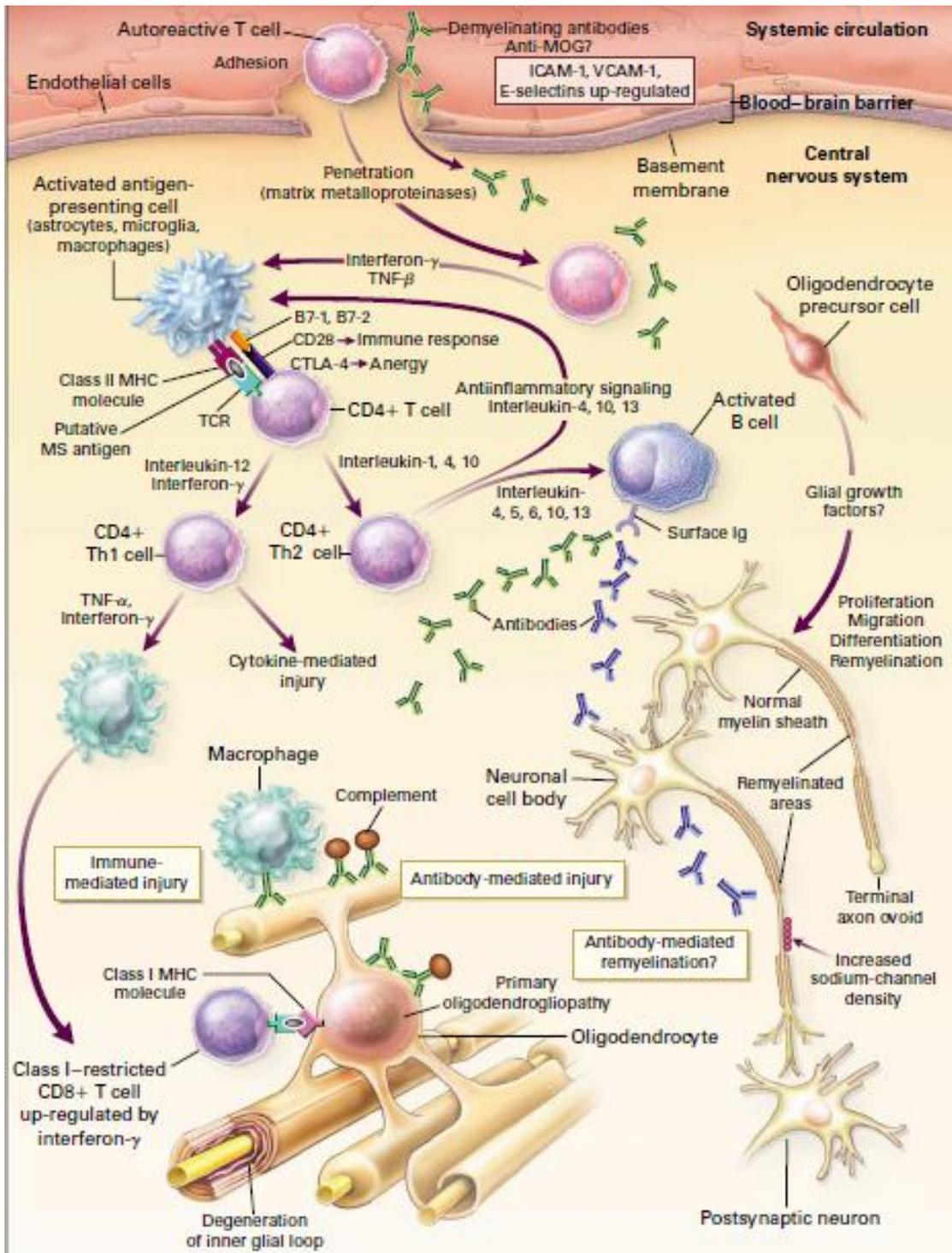


Abb.1: Pathogenese der MS (aus Noseworthy et al., 2000, Review NEJM 2000)

### 1.1.3 Therapie

Aufgrund des unvollständigen Verständnisses der Immunpathogenese ist eine kausale Therapie der MS derzeit nicht möglich. Gängige Therapien haben ihren Angriffspunkt in der derzeitig postulierten Immunpathogenese und basieren insgesamt auf der Modulation des Immunsystems. Ziele sind Folgen von akuten Schüben zu verhindern, die Schubdauer zu verkürzen und die Schubhäufigkeit zu reduzieren.

Akute Schübe werden dabei gewöhnlich mit einer intravenösen Gabe von Kortikosteroiden (Methylprednisolon) in einer Dosierung von 1000mg täglich, für 3 – 7 Tage therapiert.

Zugelassen für eine krankheitsmodulierende Therapie sind derzeit Interferone, Glatirameracetat, sowie in bestimmten klinischen Konstellationen Azathioprin, die intravenöse Applikation von Immunglobulinen (IVIg) und monoklonalen Antikörpern, wie z.B. Natalizumab. Diese Stoffe bewirken eine Reduktion der Schubhäufigkeit, ein langsames Fortschreiten der Behinderung, sowie eine langsamer Anhäufung von Läsionen in der Magnetresonanztomographie (MRT). Derzeit finden hauptsächlich Interferon beta- 1b (Betaferon) in einer Dosierung von 8 Mio Injektionseinheiten (IE) alle 2 Tage subcutan (s.c.) oder Interferon beta- 1a (Avonex) wöchentlich 6 Mio Injektionseinheiten (IE) intramuskulär (i.m.) ihre Anwendung.

Glatirameracetat (Copaxone®) ist ein Kopolymer aus vier Aminosäuren (AS) (Glutaminsäure, Lysin, Alanin und Tyrosin). Das immunmodulatorische Potential von Glatirameracetat beinhaltet eine Bindung an MHC-Molekülen und eine Konkurrenz mit Myelin- Antigenen um die T-Zell-Präsentation. Zusätzlich hierzu aktiviert Glatirameracetat das anti-inflammatorische Th2 – T- Zell-Profil und vermittelt direkte immunsuppressive Wirkung (Arnon und Aharoni, 2004).

Azathioprin findet bei anderer Autoimmunerkrankungen häufige Anwendung und zeigt auch bei der MS in älteren Metanalysen eine signifikante Reduktion der Schubhäufigkeit, wird aber nur angewendet, wenn andere Therapien wegen Nebenwirkungen oder mangelnder Wirksamkeit nicht indiziert sind.

Neben den genannten Standardmedikamenten, können weitere Medikamente zur Therapieeskalation herangezogen werden. Mitoxantron z.B. wird wegen der bekannten Kardiotoxizität nur für Patienten mit schnell fortschreitender Erkrankung und schlechtem Ansprechen auf andere Therapieformen empfohlen (Goodin et al., 2003).

Die Applikation von i.v. Immunoglobulinen wird immer wieder durchgeführt, bei unklarem Wirkungsmechanismus aber kontrovers diskutiert (Fergusson et al., 2005; Sorensen et al., 2004).

Neuere Medikamente versuchen direkt in einzelne Schritte der Immunpathogenese einzugreifen. Hierzu gehört der monoklonale Antikörper Natalizumab, der gegen Alpha-4-Integrine gerichtet ist und durch Blockierung von Alpha-4 Integrinen auf Monozyten und Lymphozyten, deren Adhäsion an das Adhäsionsmolekül VCAM auf Gefäßendothelien und damit die Einwanderung von Lymphozyten ins ZNS limitiert (Rice et al., 2005). Aufgrund zweier Patienten, die 2005 bei kombinierter Therapie mit Natalizumab eine progressive multifokale Leukencephalopathie (PML) entwickelt hatten, wird Natalizumab derzeit nur als Monotherapie verwendet. Eine placebokontrollierte Studie konnte eine signifikante Reduktion von Gadolinium-aufnehmenden Läsionen im MRT, sowie einen deutlichen Rückgang der Schübe zeigen (Miller et al., 2003).

Weitere monoklonale Antikörper mit verschiedenen Angriffspunkten werden derzeit getestet, wie z.B. Rituximab (Anti- CD20) (Hauser et al., 2008), Dacluzimab (Anti- CD25) (Bielekova et al., 2009) und Alemtuzumab (Anti- CD52) (Coles et al., 2008), mit dem Ziel T-Zell-Aktivierung zu reduzieren, bestimmte B-Zelltypen zu unterdrücken oder deren Zirkulation zu verhindern.

Zu den neueren Substanzen gehört auch Fingolimod (FTY720), ein Sphingosin-Analogon (Kappos et al, 2010), das in Lymphknoten die Sphingosin 1 Phosphat Rezeptoren von T-Zellen und B-Zellen blockiert und so das Ausschwemmen in den Blutkreislauf und damit das Einwandern in das ZNS verhindert. Dadurch konnte eine Reduktion der Schubhäufigkeit und ein langsames Fortschreiten der Erkrankung im Vergleich zu Placebo, (Kappos et al, 2010), aber auch im Vergleich zu i.m. Interferon beta- 1a erreicht werden (Cohen et al. 2010).

## **1.2 Tiermodelle / Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)**

Die Betrachtung der MS als weitgehend T-Zell vermittelte Erkrankung, begründet sich hauptsächlich in der Entwicklung des Tiermodells der MS, der Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). Die Ursprünge dieses Modells reichen in die 20er Jahre zurück, wo Koritschoner und Schweinburg Rückenmarksentzündung in Hasen durch Immunisierung mit humanem Rückenmark auslösen konnten (Koritschoner und Schweinberg, 1925).

1933 konnten Rivers et al. (Rivers et al., 1933) die ZNS-Komplikationen, die bei Tollwutimpfungen auftraten, durch wiederholte Immunisierung von Rhesus-Affen mit ZNS- Gewebe reproduzieren. Seitdem konnte das Modell in vielen verschiedenen Spezies etabliert werden. Der Einsatz von Freund´schem Adjuvans (Kabat et al., 1951) und hitze-inaktivierten Mykobakterien tuberculosis (CFA = komplettes Freund´sches Adjuvans), konnte die notwendige Injektionshäufigkeit bis zur suffizienten Immunantwort deutlich senken. Heute gibt es eine Vielzahl von gut etablierten Ratten-, Maus, und Primatenmodellen für die EAE. Die EAE kann viele klinische, neuropathologische und immunologische Aspekte der MS imitieren (Hohlfeld und Wekerle, 2001), wodurch man sich ein zunehmendes Verständnis des Pathomechanismus der MS erhoffte. Diese Ansicht stellte sich aber schnell als ungenügend heraus, weil deutlich wurde, dass die EAE nicht als einziges und perfektes Modell der MS dienen kann.

Die EAE wird durch Immunisierung susceptibler Tiere mit Myelinantigenen und komplettem Freund´schem Adjuvans (CFA) induziert (Wekerle, 1992). Das Ausmaß der Erkrankung hängt dabei stark vom genetischen Hintergrund des Tieres und dem verwendeten Antigen ab (Weissert et al., 1998; Rosche et al., 2003). Als Antigen finden klassischerweise Myelinkomponenten wie Myelin basisches Protein (MBP), Proteolipoprotein (PLP) oder Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) Verwendung.

Eine andere Möglichkeit die EAE zu induzieren, ist der passive Transfer von Myelin-reaktiven CD4+ - Zellen (Ben-Nun et al., 1981) oder CD8+ T-Zellen (Huseby et al., 2001, Cabarrocas et al., 2003). In diesen Modellen konnte gezeigt werden, dass der Transfer von CD4+ Zellen aus erkrankten Tieren eine EAE in naiven Tieren auslösen kann (Waldor et al., 1985) und vor allem CD4+

Zellen vom Typ Th1 mit ihrem Zytokinmuster und der Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL2 eine bedeutende Rolle spielen (Zamvil und Steinmann, 1990). Eine Bedeutung von MHC für die Suszeptibilität wurde in einer MBP induzierten EAE schon intensiv untersucht (Wekerle et al., 1994), wobei sich je nach MHC Haplotyp eine Induzierbarkeit, oder Resistenz gegenüber einer EAE zeigte. Da die MBP induzierte EAE eine ausschließlich T-Zell vermittelte Erkrankung ist, erschien dieses Ergebnis zu stark vereinfacht, um es auf die menschliche MS zu übertragen. Deshalb wurde mit dem Modell der MOG induzierten EAE, das die Komplexität der Immunantwort, mit einer T-Zell ausgelöst, aber im Weiteren auch B-Zell, Antikörper und Komplement vermittelten Erkrankung, besser widerspiegelt, der Einfluss des MHC Haplotypen auf die Suszeptibilität der EAE erneut untersucht. Hierzu wurden von Weissert et al. verschiedenen MHC kongene LEW Rattenstämme genutzt und mit MOG eine EAE induziert. Diese Tiere unterscheiden sich dabei lediglich im MHC Haplotypen, entwickeln aber einen sehr unterschiedlichen Krankheitsverlauf. Während LEW.1N (RT1<sup>n</sup>) Ratten einen schnell einsetzenden, akuten Krankheitsverlauf mit Paraparese, Ataxie, frühem Tod und eine deutliche Plaquebildung im ZNS zeigen, entwickeln LEW.1A (RT1<sup>a</sup>) und LEW.1AV1 (RT1<sup>av</sup>) Ratten einen chronischen Krankheitsverlauf, wohingegen LEW. Ratten (RT1<sup>l</sup>) keine Anzeichen einer EAE entwickeln. Bemerkenswerter Weise waren auch die histopathologischen Veränderungen und die Stärke der Immunantwort durch den Typ des MHC II Allels beeinflusst. Während LEW.1N schon an Tag 12 nach Immunisierung eine weitverbreitete Demyelinisierung im ganzen ZNS mit starker Zellinfiltration zeigten, waren LEW.1A und LEW.1AV1 am Tag 12 weniger betroffen, zeigten nur kleine entzündliche und demyelinisierende Areale, entwickelten dann aber zum Tag 40 größere Demyelinisierungsherde. Weiterhin war die Möglichkeit eine EAE bei den hoch suszeptiblen RT1 kongenen Rattenstämmen LEW.1N und LEW.1A auszulösen, abhängig von der Antigen dosis, was nicht nur die Schwere der Erkrankung selbst, sondern auch den Krankheitsverlauf beeinflusste. Zusammengefasst kann die Region RT1.B/D im MHC II als hauptverantwortlich für die Suszeptibilität bei der MOG induzierten EAE gesehen werden (Weissert et al., 1998).

Zusätzlich zu dem Nutzen als Modell der Immunpathologie kann die EAE auch als Modell genutzt werden, Axonschädigungen, Demyelinisierende Plaques und kortikale Demyelinisierung zu untersuchen. Dafür eignen sich insbesondere chronische EAE- Modelle in Mäusen und Ratten (Kornek et al., 2000).

### **1.3 Neurodegeneration in EAE und MS**

Inzwischen erscheint es als gesichert, dass die MS nicht eine rein immunpathologische Genese besitzt, sondern dass neben der Demyelinisierung und auto-immunen Entzündung auch eine neurodegenerative Komponente mit Nervenzell- und Axonverlust eine Rolle spielt. Der Axon- und Nervenzellverlust wird dabei für den bleibenden Grad der Behinderung der Patienten verantwortlich gemacht. Eine Schädigung von Oligodendrozyten, Neuronen und Axonen wurde schon seit Längerem beschrieben (Kornek und Lassmann, 1999; Bitsch et al., 2000; Bjartmar und Trapp, 2001).

Die axonale Schädigung erfolgt schon bei Krankheitsbeginn und korreliert mit dem Grad der Entzündung in den MS-Läsionen. Diese Entwicklung kann jahrelang unerkannt bleiben, sind die Reserven des ZNS aber erschöpft und der Axonverlust überschreitet ein kritisches Ausmaß, kommt es zu bleibenden Behinderungen bei den Patienten. Bei Mäusen mit EAE konnte gezeigt werden, dass bis zu 15-30% der Axone des Rückenmarks untergehen können, bis eine wahrnehmbare neurologische Beeinträchtigung entsteht (Bjartmar et al., 2003). Eine Axondegeneration bei der Multiplen Sklerose wurde schon von Charcot (Charcot 1880) beschrieben, der klassische pathologische Komponenten der Axondegeneration in seiner Erstbeschreibung der MS darstellte. Genauere Mechanismen von direktem Nervenzelltod bis zu subtileren Mechanismen der Neurodegeneration wurden bereits wenig später von Dawson (Dawson 1916) untersucht. Komplexere immunhistochemische Färbungen ermöglichten den Untergang von Axonen und Zellkörpern in der grauen Substanz von MS-Patienten zu sichern (Peterson et al., 2001).

Diese Merkmale der Neurodegeneration mit Zellkörperuntergang und Axondegeneration können auch in Maus- oder Rattenmodellen der Multiplen Sklerose

induziert und nachgewiesen werden (Kornek et al., 2000; Meyer et al., 2001; Diestel et al., 2003).

Tatsächlich zeigt sich in verschiedenen EAE-Modellen schon früh im Krankheitsverlauf sowohl eine Demyelinisierung als auch ein Axonverlust (Hobom et al., 2004; Aktas et al., 2005), der genaue Pathomechanismus bleibt aber noch zu beleuchten.

Betrachtet man frühe Axonunterbrechungen in Tiermodellen, scheinen sie direkt mit den entzündlichen Infiltraten in den MS-Läsionen zu korrelieren (Trapp et al., 1998; Bitsch et al., 2000). Bei näherer Betrachtung hingegen findet man aber auch subpiale kortikale Demyelinisierungsherde und Axonschädigungen und Nervenzellverlust in nichtdemyelinisierten normal erscheinender weißer Substanz, ohne den Hinweis auf entzündliches Infiltrat (Bø et al., 2003; Kutzelnigg et al., 2005).

Die diskutierten molekularen Mechanismen reichen von Schädigung durch akut aufgetretenen Nervenzellschwellung, Störung der Elektrolytbalance (Bjartmar et al., 2003), mitochondrialer Dysfunktion (Dutta et al., 2006), von T-Zellen und Makrophagen sezernierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS), bis zur direkten zytotoxischen Schädigung durch CD8+ T-Zellen, die gehäuft in der Nachbarschaft von geschädigten Axonen gefunden werden (Bitsch et al., 2000). Weiterhin werden klassische Mechanismen der Neurodegeneration, die aus anderen Erkrankungen wie z.B. der Alzheimer'schen Erkrankung bekannt sind, diskutiert.

Klar ist, dass Demyelinisierung und neuronale Schädigung in den gängigen Modellen gleichzeitig bestehen, weitgehend unklar ist aber, in wieweit der immunvermittelte Angriff auf die Myelinscheiden oder eine direkte Zerstörung der Axone zu einem neuronalen Schaden führt.

Die genauen Abläufe und die Reihenfolge der Ereignisse in dieser Kaskade sind weitgehend unklar und Beobachtungen, dass ZNS-Entzündungen ein Trigger für klassische nicht-entzündliche neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer, sein können, erfordert eine nähere Betrachtung der Abläufe und Mechanismen. Dies wird dadurch unterstützt, dass CD4+ T-Zell basierende immunmodulierende Therapie mit Glatirameracetat in experimentellen Modellen

der Neurodegeneration erfolgsversprechend erscheinen (Angelov et al., 2003; Benner et al., 2004; Frenkel et al., 2005).

Die Beobachtung axonaler Schwellung und der Anreicherung von Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) bei MS-Patienten und EAE-Modellen, lässt die Vermutung zu, dass Störungen des axonalen Transports ein weiterer möglicher Mechanismus der Axonschädigung sein könnten (Ferguson et al., 1997; Trapp et al., 1998; Shriver und Dittel, 2006).

Ein veränderter axonaler Transport spielt bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer oder hereditärer frontotemporaler Demenz bekanntermaßen eine Rolle und wird dabei durch eine Hyperphosphorylierung und Aggregation von Tauprotein charakterisiert (Mandelkow et al., 2003; Stokin et al., 2005; Goedert und Spillantini, 2006).

Bei Tau handelt es sich um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das für den Zusammenhalt und die Stabilisierung der Mikrotubuli verantwortlich ist und damit essentiell für den axonalen Transport erscheint. Eine unphysiologische Phosphorylierung von Tauprotein resultiert in einer Destabilisierung der Mikrotubuli und kann zu neurotoxischen Ablagerungen führen (Allen et al., 2002; Johnson und Stoothoff, 2004; Bandyopadhyay et al., 2007).

Eine derartige Hyperphosphorylierung konnte inzwischen auch in Maus- und Rattenmodellen mit EAE (Schneider et al., 2004; Anderson et al. 2008) und in Gehirngewebe von Verstorbenen mit sekundär progredienter chronischer MS nachgewiesen werden (Anderson et al. 2008) und führt damit zu einem weiteren noch wenig erforschten Mechanismus der Axondegeneration in MS und EAE.

### **1.4 Tauprotein**

Bezogen auf die eben erörterte neurodegenerative Komponente der MS, bei der eine Axondegeneration sichtbar ist, muss kurz auf die Funktionsweise und die Architektur von Axonen eingegangen werden. Ein axonaler Transport ist für die Funktion von polaren Nervenzellen unerlässlich. Die Informationsweiterleitung und Informationsverarbeitung ist abhängig von der zellulären Architektur und wird dabei hauptsächlich durch Bestandteile des Zytoskeletts bestimmt.

Dabei unterscheidet man histologisch 3 Zytoskelettbestandteile, Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Bei den Mikrotubuli handelt es sich um dynamische Zellbestandteile, die in der gesamten Nervenzelle ubiquitär verteilt sind, und neben der Stabilisierung der Nervenzelle auch für motile Prozesse verantwortlich sind. Eine wichtige Aufgabe von Mikrotubuli ist der axonale Vesikeltransport, der die Nervenzellenden mit essentiellen Bestandteilen versorgt und einen Rücktransport endozytierten Materials zurück zum Soma ermöglicht (Vale et al., 1992).

Die Integrität des Zytoskeletts ist kritisch für die Funktion und das Überleben der Nervenzellen. Viele neurodegenerative Erkrankungen sind durch pathologische Veränderungen im Zytoskelett charakterisiert. Wie bereits mehrfach erwähnt ist das mikrotubuliassoziierte Protein Tau bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer'schen Krankheit, aber auch bei der Multiplen Sklerose durch Hyperphosphorylierung pathologisch verändert.

Tau-Proteine sind niedermolekulare mikrotubuliassoziierte Proteine (MAPs), die vorwiegend in Nervenzellen, aber in geringem Maße auch in Astrozyten und Oligodendrozyten vorliegen (Papazomenos und Binder; 1987, Migheli et al., 1988). Im humanen ZNS finden sich 6 Isoformen des Tau-Proteins, die durch alternatives Spleißen der Exone 2, 3 und 10 einer mRNA generiert werden und sich hauptsächlich im Axon befinden (Binder et al., 1985).

Die Interaktion von Tau und Mikrotubuli wird durch drei oder vier C-terminale sehr homologe Sequenzen bestehend aus 31 oder 32 Aminosäuren vermittelt. Die Mikrotubuli-Bindestelle wird auch als „Repeat“-Domäne bezeichnet. Sie ist *in vitro* für die Tubulin-Polymerisierung und die Stabilisierung der Mikrotubuli entscheidend (Lee et al., 1989; Butner und Kirschner, 1991).

Tau wird zur Gruppe der Phosphoproteine gerechnet, und der Grad der Tau-phosphorylierung beeinflusst seine Funktion. Durch die Möglichkeit der Phosphorylierung an spezifischen Stellen im Tau-Protein wird die Bindung an verschiedene Interaktionspartner reguliert; so verhindert z.B. eine Phosphorylierung an Serin 262 in der mikrotubulibindenden Domäne eine Bindung an Mikrotubuli (Drewes et al., 1995). Außerdem beeinflusst phosphoryliertes Tau die Tubulin-Polymerisation negativ, wohingegen unphosphoryliertes Tau eine

Polymerisation begünstigt (Lindwall und Cole, 1984; Biernat et al., 1993; Bramblett et al., 1993). In vitro ist Tau Substrat verschiedener Kinasen, wie z.B. der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängigen Kinase II (CaMKII), der MAP Kinase, der Glykogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) und der cAMP-abhängigen Protein Kinase (PKA) (Pierre und Nunez, 1983; Steiner et al., 1990; Drewes et al., 1992; Hanger et al., 1992). Als Phosphatasen sind z.B. die Protein Phosphatasen 2A und -2B (Calcineurin) zu nennen (Wang et al., 1995; Gong et al., 1994).

Allerdings ist noch weitgehend unklar, welche Kinasen und Phosphatasen Tau in vivo phosphorylieren bzw. dephosphorylieren.

Bei einer Reihe als Tauopathien bezeichneten neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer, Morbus Pick, Progressive supranukleäre Blickparese, Kortikobasale Degeneration), findet man in den Nervenzellen und Axonen abnorm hyperphosphoryliertes Tau. Kommt es zu einer starken Hyperphosphorylierung nehmen die Tauproteine eine bestimmte Konfiguration ein, die bei derartigen Erkrankungen zu finden ist. Dabei unterscheidet man „Straight filaments“ (SF) und „Paired helical filaments“ (PHF), die sich ultrastrukturell unterscheiden (Kidd, 1963); während PHFs aus zwei umeinander gewundenen Strängen besteht, besitzen SFs keine helikale Struktur. Verschiedene Überlegungen, dass SFs die Vorläufer von PHFs sein könnten, wurden verfolgt (Crowther und Wischik, 1985; Crowther, 1991; Ksiezak-Reding et al., 1996), klar hingegen ist, dass aus PHFs isoliertes Tau ca. 3-4 Mal stärker phosphoryliert (6-8 mol Phosphat/mol Tau) ist, als Tau aus einem gesunden Gehirn (1,9 mol Phosphat/mol Tau) (Kenessey und Yen, 1993). Für diesen Umstand wird ein geändertes Kinasen/Phosphatasen-Gleichgewicht verantwortlich gemacht. Eine krankhaft erhöhte Kinase-Aktivität oder eine verminderte Aktivität bestimmter Phosphatasen resultiert demnach in einer Hyperphosphorylierung von Tau, z. B. wurde eine erhöhte Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (CDK5) und der cAMP-abhängigen Kinase PKA in Hirngewebe von Alzheimer-Patienten (Patrick et al., 1999; Jicha et al., 1999), aber auch in EAE-Modellen nachgewiesen (Schneider et al., 2004). Zudem gibt es Ergebnisse, die eine verringerte Aktivität verschiedener Protein-Phosphatasen bestätigen (Gong et al., 1993). Wie es

zu diesen Veränderungen in der Kinase-/Phosphatase-Aktivität kommt, ist weitgehend unbekannt.

Im Gegensatz zu Tau aus gesunden Gehirnen ist PHF-Tau nicht in der Lage an Mikrotubuli zu binden oder die Mikrotubulipolymerisation zu fördern (Yoshida und Ihara, 1993; Alonso et al., 1994).

Ob die Mikrotubuli-bezogenen Funktionen von Tau und eine durch Destabilisierung der Mikrotubuli verursachte Axondegeneration, eine primäre Rolle in der Neurodegeneration spielt, oder ob die Hyperphosphorylierung eher einen „rescue“-Mechanismus darstellt, der die Menge von frei löslichem hyperphosphoryliertem Tau durch Bildung von PHF's reduziert, bleibt weiterhin umstritten. Einerseits spricht die Tatsache, dass eine Behandlung mit Taxol, einem Mikrotubuli-stabilisierenden Agens, den toxischen Effekt von PHF-Tau nicht aufhebt (Fath et al., 2002), gegen die These, dass alleinig die Destabilisierung der Mikrotubuli die Neurodegeneration auslöst, andererseits lässt sich eine Assoziation zwischen destabilisierten Mikrotubuli und Neurodegeneration nicht widerlegen.

### **1.5 Cyclin-abhängige Kinase 5 (CDK5) und ihre Regulation**

Aufgrund der Möglichkeit Tau zu phosphorylieren ist die cyclin-abhängige Kinase 5 (CDK5) bei der Erforschung neurodegenerativer, autoimmuner oder toxischer ZNS-Erkrankungen zunehmend ins Interesse gerückt. Die CDK5 gehört zur Gruppe der cyclin-abhängigen Serin/Threonin-Kinasen. Die CDK5 hat ca. 60% Homologie mit der menschlichen CDK2 und der zellteilung-regulierenden zyklischen Kinase 2 (CDC2) (Hellmich et al., 1992; Lew et al., 1992; Meyerson et al., 1992).

Anders als die meisten zyklischen oder cyclin-abhängigen Kinasen spielt CDK5 keine bekannte Rolle in der Regulation oder Vermittlung des Zellzyklus. CDK5 wird ubiquitär exprimiert, aber eine nennenswerte Aktivität findet sich nur in postmitotischen Neuronen (Tsai et al., 1993). Die Ursache für diese Tatsache findet sich in der fast ausschließlich auf postmitotische Neuronen im ZNS begrenzten Expression der CDK5 – Aktivatoren p35 und p39 (Lee und Tsai, 2003). CDK5 ist essentiell für die Gehirnentwicklung, z.B. für die Entwicklung

der Rindenarchitektur mit korrekter Schichtung des Cortex (Ohshima et al., 1996; Chae et al., 1997; Gupta et al., 2003), vermutlich durch die Vermittlung einer Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen im Rahmen der radialen Migration. Weitere wichtige Funktionen besitzt CDK5 in der neuronalen Differenzierung, synaptischer Plastizität (Li et al., 2001), zellulärer Mobilität und Adhäsion. Auch bei pathologischen Zuständen wurde eine Rolle für CDK5 nachgewiesen, z.B. bei Drogenabhängigkeit (Bibb et al., 2001) oder Neurodegeneration (Patrick et al., 1999).

Für die Aktivierung der Kinase ist eine Heterodimer-Bildung von CDK5 mit den Aktivatoren p35 oder p25 (dem geschnittenen Carboxyl-Ende von p35), bzw. p39 oder p29 (dem geschnittenen Carboxyl-Ende von p39) notwendig (Lew et al., 1994; Uchida et al., 1994; Tang et al., 1995; Patzke und Tsai 2002).

Eine Proteinkristallisierung des CDK5/p25 Komplexes zeigte, dass sich p25 in eine cyclinähnliche Konformation faltet und die T-Schleife der CDK5 in ihre aktive Position bindet (Tarricone et al., 2001). Im Vergleich dazu benötigen andere CDK/Cyclin – Komplexe eine Phosphorylierung von Tyrosin 160 oder 161 in der T-Schleife, um eine Aktivierung zu vermitteln (Jeffrey et al. 1995). Ganz im Gegenteil hierzu vermindert die Phosphorylierung des CDK5/p25 Komplexes am Ser159 eine CDK5 -Aktivierung durch erschwerte p25/CDK5 Bindung (Tarricone et al., 2001). Der Aktivator p35 hat eine Halbwertszeit  $t_{1/2} = 20 - 30$  min und wird durch Autophosphorylierung durch den CDK5/p35-Komplex inaktiviert und so vor einer Spaltung in p25 durch Calpain geschützt. Der Abbau erfolgt durch Ubiquitinierung über das Proteasom (Patrick et al., 1998; Saito et al., 2003). Der Aktivator p35 besitzt dabei einen mit einem Membrananker versehenen Anteil (p10), so dass der CDK5/p35 Komplex membranständig lokalisiert ist. Bei einer  $Ca^{2+}$  abhängigen Spaltung von p35 zu dem Aktivator p25 durch Calpain, kommt es zu einer Verlagerung des CDK5/p25 – Komplex weg von der Zellmembran und p25 hat dabei die Fähigkeit die CDK5 verlängert und verstärkt zu aktivieren, was zu einer Hyperphosphorylierung der betreffenden Substrate führt (Patrick et al., 1998, 1999; Patzke und Tsai, 2002).

Desweiteren wird der CDK5 zunehmend eine Rolle bei der Regulierung des neuronalen Zellüberlebens zugeschrieben, wobei in Abhängigkeit vom Substrat

oder Zelltyp, sowohl pro-, als auch antiapoptotische Funktionen bekannt sind. Wegen erhöhter CDK5 Aktivität bei Apoptose in vitro und Ergebnissen, die neuronale Apoptose nach Überaktivierung von p25/CDK5 zeigten, (Patrick et al., 1999) wurde eine rein proapoptotische Rolle vermutet. Zusätzlich dazu konnte gezeigt werden, dass CDK5 – Inhibitoren protektiv gegenüber Nekrose und Apoptose in verschiedenen Modellen des neuronalen Zelltods wirken konnten (Weishaupt et al., 2003). Obwohl man die genauen Mechanismen noch nicht kennt, konnte gezeigt werden, dass CDK5 Einfluss auf verschiedene Transkriptionsfaktoren hat, die ihrerseits eine wichtige Rolle in Signalwegen von Apoptose- und Zellüberleben spielen. Einer der besser untersuchten Faktoren ist der Myocyte-enhancing Faktor 2 (MEF2), der eine antiapoptotische Wirkung besitzt und damit eine essentielle Rolle im neuronalen Zellüberleben spielt. Eine Phosphorylierung von MEF2 an Serin444 unterbindet die Kapazität von MEF2 einen exotoxisch- oder durch oxidativen Stress verursachten Zelltod zu verhindern (Gong et al., 2003). Ein weiteres nukleäres Substrat von CDK5 ist p53 ein proapoptotischer Faktor (Morrison et al., 2003), der durch CDK5-Phosphorylierung in seiner Aktivität gesteigert wird (Zhang et al., 2002). Auch wenn alle diese Ergebnisse mögliche Mechanismen des CDK5 vermittelten neuronalen Zelluntergangs zeigen, wurden auch antiapoptotische Wirkungen von CDK5 beschrieben, wie z.B. die Phosphorylierung von ErbB2 und ErbB3 (Li et al., 2003). Diese unterschiedlichen Daten zeigen eine vielschichtige und essentielle Rolle für CDK5 im neuronalen Zellüberleben mit pro- und antiapoptotischen Komponenten. Dabei scheint es auf Aktivatoren, Substrate und auf den Zustand der Zelle anzukommen, welche Wirkungsweise CDK5 letztendlich vermittelt.

### **1.6 Tauphosphorylierung, CDK5, p25/p35 und Calpain in ihrer Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen**

Eine Ablagerung von hyperphosphoryliertem Tau wird als bekannte Erscheinung bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen (den Tauopathien), wie z.B. Morbus Alzheimer betrachtet. Diese Ablagerungen setzen sich aus nicht funktionell hyperphosphoryliertem Tau zusammen, welches sich zu „paired helical

filaments“ (PHF´s) oder „straight filaments“ (SF´s) zusammenlagert und in der Folge (zumindest bei der Alzheimer-Erkrankung) „Neurofibrillary tangles“ (NFT´s) ausbildet (Johnson und Hartigan, 1999; Johnson und Bailey, 2002). Wie oben beschrieben wurde Tau als eines der Substrate der CDK 5 entdeckt und CDK5 besitzt die Möglichkeit Tau an verschiedenen Stellen, wie z.B. Ser<sub>202</sub>, Thr<sub>205</sub>, Thr<sub>212</sub>, Ser<sub>235</sub>, Ser<sub>396</sub> und Ser<sub>404</sub> zu phosphorylieren (Nummerierung erfolgt anhand der längsten humanen Tau-Isoform mit 441 AS). Da es sich bei den genannten Phosphorylierungsstellen zum Teil um die Selben handelt, die auch bei PHF-Tau und NFT´s phosphoryliert sind (Paudel et al., 1993), wurde angenommen, dass CDK5 eine Rolle in der Alzheimer Pathologie spielt. Eine verstärkte Tau Phosphorylierung mit oder auch ohne Bildung von PHF´s, bzw. NFT´s konnte sowohl in Zellkulturen mit erhöhter p25 Expression (Patrick et al., 1999), als auch in verschiedenen transgenen Mausmodellen mit verstärkter oder regulierbarer p25 Expression nachgewiesen werden (Ahlijanian et al., 2000; Bian et al., 2002). Weiterhin konnte unter verschiedenen Bedingungen gezeigt werden, dass eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> - Erhöhung zu einer verstärkten Calpain Aktivierung und damit Calpain abhängigen Spaltung von p35 zu p25 führt und so in einer Überaktivierung der CDK5 resultiert (Lee et al., 2000). Unter anderem kam es durch oxidativen Stress, Glutamat-Administration, β-Amyloid-Behandlung zu besagtem Ca<sup>2+</sup>- Anstieg, einer Calpain - abhängigen p35/p25 Spaltung, was eine Überaktivierung der CDK5 mit Hyperphosphorylierung von Tau, Tauaggregation und Apoptose vermittelte und eine neurotoxische Wirkung der überaktivierten CDK5 vermuten lässt (Alvarez et al., 2001; Lee et al., 2000, Li et al., 2003; Town et al., 2002). Ein Zusammenhang zwischen CDK5 Überaktivierung und Neurodegeneration wurde auch bei anderen Erkrankungen, wie Amyotropher Lateralsklerose (ALS), Niemann- Pick Typ C, aber auch Ischämien und Morbus Parkinson untersucht (Bu et al., 2002; Lee et al., 1999; Nguyen et al., 2001; Patrick et al., 1999). Dabei zeigte sich unter anderem, dass eine CDK5 Überaktivierung durch eine Calpain abhängige p35/25 Spaltung in einem MPTP (1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6 Tetrahydropyridine) - induzierten Mausmodell der Parkinsonerkrankung eine MEF 2 (Myocyte – Enhancing – Faktor 2) abhängigen dopaminergen Zelluntergang in der Sub-

stantia nigra der Versuchstiere verursachte (Smith et al., 2006). Eine Inhibierung von Calpain mit Hilfe eines exogenen Inhibitors (MDL-28170) oder einer adenoviral vermittelten Überexpression des endogenen Calpainregulators Calpastatin, konnte bei einem weiteren MPTP- induzierten Mausmodell diesen neurotoxischen Effekt abschwächen (Crocker et al., 2003).

Weiterhin konnte in Neuronen gezeigt werden, dass ein p35-Spaltprodukt (AS-Rest 154- 279) in der Lage ist, spezifisch an p25/CDK5 zu binden und dessen Aktivität zu mindern (Zheng et al., 2002). Dieses als CIP (CDK5 Inhibitor Protein) bezeichnete Spaltprodukt konnte eine Hyperphosphorylierung von Tau und eine damit einhergehende Apoptose von Neuronen reduzieren (Zheng et al., 2005). Aufgrund seiner höheren Spezifität für p25/CDK5 schien es einen Benefit gegenüber den exogenen CDK5 Inhibitoren Roscovitine und Olomoucine zu besitzen.

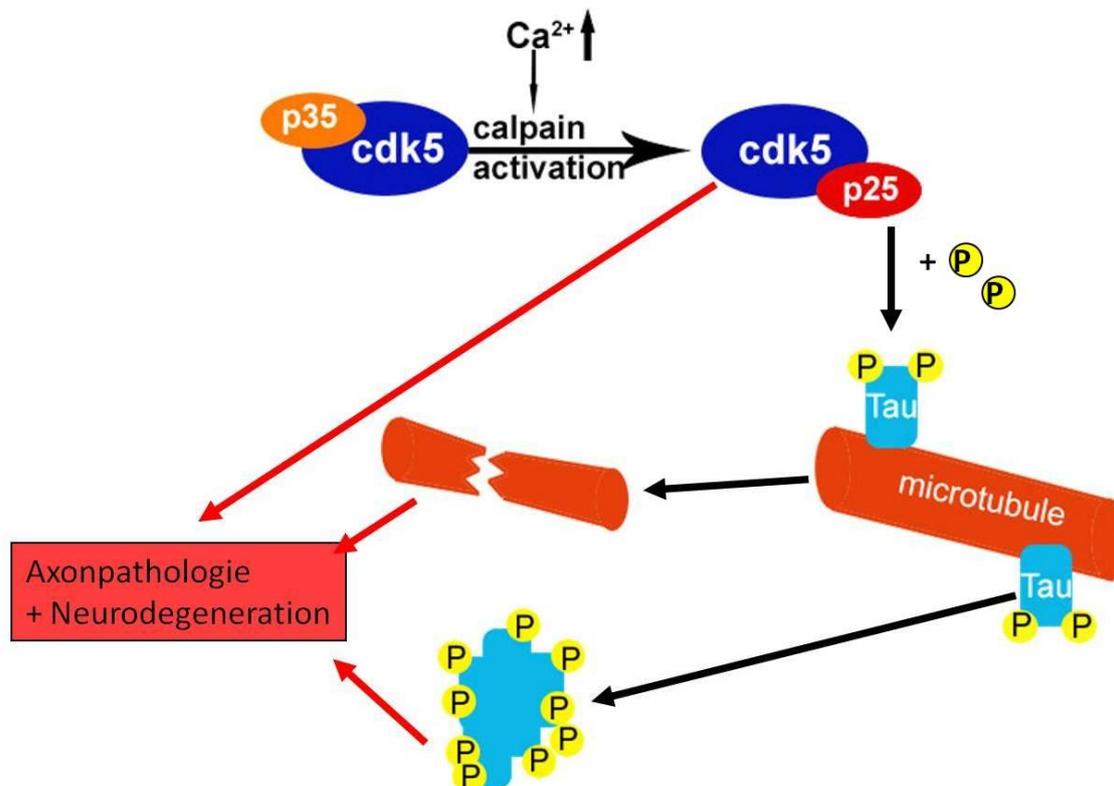
### **1.7 Tauphosphorylierung, CDK5, p25/p35, p29/p39, Calpain und ihre Rolle in der EAE**

Zusätzlich zu den oben dargestellten Ergebnissen, die die mögliche Rolle einer Tauphosphorylierung bei neurodegenerativen Erkrankungen propagieren, konnte auch eine Hyperphosphorylierung von Tau in Hirnpräparaten von MS-Patienten und bei der EAE, gezeigt werden (Schneider et al., 2004). Dabei wurde bei weiblichen LEW.1N Ratten durch die Applikation von 50µg rekombinanten Ratten MOG eine EAE induziert. Daraufhin entwickelten die Ratten eine EAE mit einem einphasigen Krankheitsverlauf. Die Tiere wurden am 12 und 13. Tag getötet und Gehirn und Rückenmark wurden zur weiteren Untersuchung aufbereitet. In der akuten Phase der Demyelinisierung geht die Erkrankung dabei mit einer starken Axonschädigung einher. In immunhistochemischen Färbungen, sowie verschiedenen Westernblots zeigte sich kein Unterschied der Gesamtmenge von Tau (Nachgewiesen mit dem Antikörper TAU5), aber eine deutliche Zunahme des hyperphosphorylierten Tau Proteins an Alzheimer-typischen Lokalisationen (Nachgewiesen durch die Antikörper PHF-1, AT-8, AT-100 und AT-180), im Durchschnitt auf das 3,5 – 4,5 fache Level. Um die molekularen Mechanismen der Tau-Phosphorylierung in der EAE besser zu verste-

hen, wurde die Aktivität verschiedener Kinasen untersucht, von denen aus anderen Studien bekannt war, dass sie eine Tauphosphorylierung an besagten Stellen bewirken. Dabei zeigte sich, dass CDK5 auch hier eine entscheidende Rolle zu spielen schien und sich das Verhältnis von p35/p25 zugunsten des p25 verschoben hat und damit eine Überaktivierung von CDK5 vermuten lässt. Immunhistochemische Färbungen paraffineingebetteter Hirnstammschnitte gegen hyperphosphoryliertes Tau zeigten eine Korrelation zwischen Axondegeneration und Tauphosphorylierung in der EAE. Dabei wurde auch eine signifikante Co-Lokalisation zwischen CDK5, p35/p25 und degenerativ veränderten Axonen gezeigt, nicht aber für andere tauphosphorylierende Kinasen. Um die Unabhängigkeit der Tauphosphorylierung vom Umstand der akuten Demyelinisierung alleine zu zeigen, wurden Mäuse mit dem Demyelinisierung-induzierenden Agens Cuprizone gefüttert, wobei diese Tiere eine akute Demyelinisierung ohne Anhalt auf eine Tauphosphorylierung zeigten.

Ein Behandlungsversuch der LEW.1N Ratten mit Prednisolon zeigte neben einem deutlich in Schwere gemilderten Krankheitsverlauf eine Reduktion der Tauphosphorylierung um über 50% und eine Verminderung der p25 und CDK5 Aktivität. Interessanterweise ist die Spaltung von p35 zu p25 abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$  - abhängigen Kinase Calpain, deren Überaktivierung und Zusammenhang mit einer Disbalance im  $\text{Ca}^{2+}$  - Gleichgewicht schon in der EAE und in MS- Gehirnen gezeigt werden konnte (Shields et al., 1999, Nitsch et al., 2004). Zusätzlich dazu zeigten Guyton et al. (Guyton et al., 2005) dass eine Hochregulierung von Calpain in der EAE mit einer Zunahme der Axonschädigung einhergeht. Die Applikation von Calpaininhibitoren konnte sowohl den klinischen Verlauf der EAE bei C57Bl/6 Mäusen positiv beeinflussen, als auch eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der entzündlichen Infiltration sowie der Demyelinisierung bewirken (Hassen et al., 2006). Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse eine Rolle des aus neurodegenerativen Erkrankungen bekannten Calpain-p35/p25- CDK5- Tau Signalweges in der EAE vermuten. Dabei könnten durch entzündliche Veränderungen, z.B. durch eine ZNS-Infiltration von Immunzellen und Ausschüttung verschiedener Zytokine einerseits, oder andererseits durch die Demyelinisierung selbst oder aber durch weitere Mechanismen ein Un-

gleichgewicht in der  $\text{Ca}^{2+}$  - Homöostase entstehen, was dann über eine Calpain, p35/p25, CDK5 - Aktivierung in einer Tau Hyperphosphorylierung und neurodegenerativen Komponente resultiert.

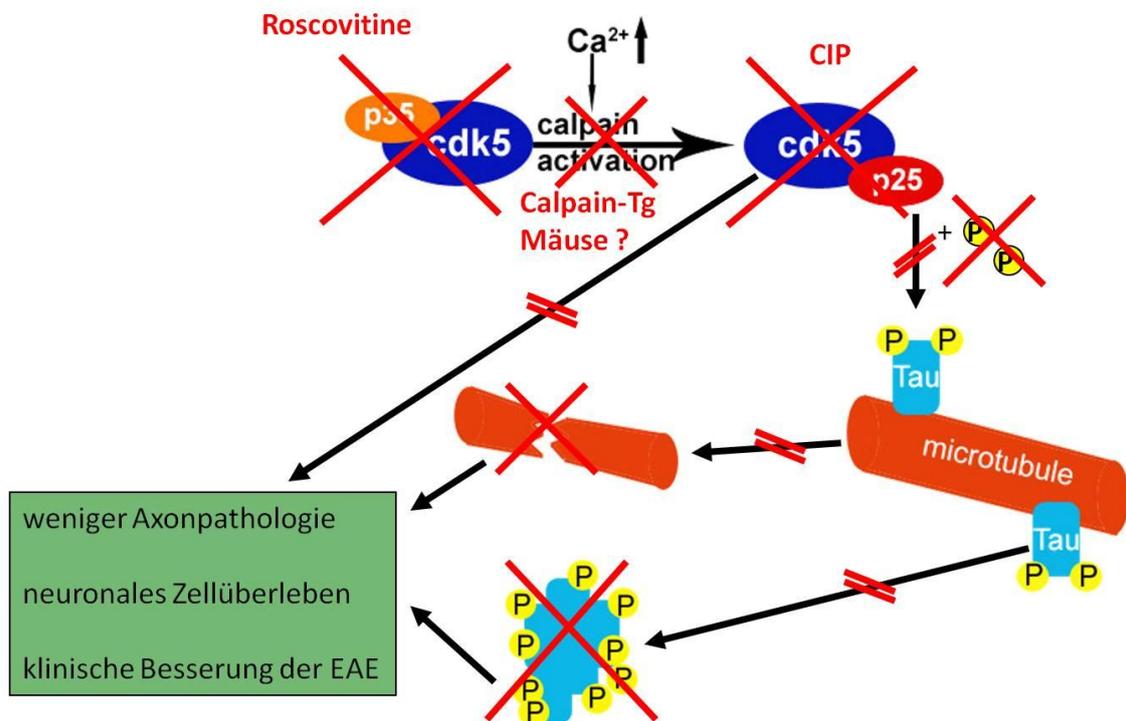


**Abb.2: Hypothese über die Wirkungsweise von CDK5/p25 Komplex und Tau-phosphorylierung in der EAE**

### 1.8 Ziel der Dissertation

Ziel der Dissertation ist es nach erneuter Induktion einer EAE in verschiedenen LEW. Rattenstämmen eine prophylaktische und therapeutische Behandlung mit unterschiedlichen CDK5 Inhibitoren durchzuführen, die in den oben beschriebenen Signalweg eingreifen und dadurch zu untersuchen, ob durch Unterbrechung, bzw. Alteration der Kaskade eine klinische Besserung im Tiermodell der EAE zu erzielen ist. Dadurch soll gezeigt werden, dass neben der bekannten immunvermittelten Komponente der EAE und der MS auch Anhalt dafür besteht, dass andere aus den neurodegenerativen Erkrankungen bekannte Pathomechanismen eine Rolle in der EAE spielen können. Kann beispielsweise die Blockierung der Proteinkinase CDK5 durch Roscovitine oder ein p25/cdk5

spezifisches Peptid, CDK5 Inhibitor Protein (CIP) (Zheng et al., 2002), eine verminderte Tauphosphorylierung auslösen und dadurch eine Verminderung der Axonpathologie und eine Reduktion der klinischen Symptomatik in der EAE erreicht werden? Unter diesen Umständen wäre ein weiterer interessanter Aspekt, ob auch eine Verminderung der Calpain vermittelten Spaltung von p35 zu p25, z.B. durch Calpastatin in einer Besserung der EAE resultieren kann und damit die gesamte Kaskade dieses Signalweges als potentielles Therapieziel der EAE dienen könnte. Insgesamt dienen diese Studien der näheren Untersuchung möglicher Signalwege der p25/cdk5 Überaktivierung, sowie der Klärung pathogenetisch relevanter Mechanismen der Axondegeneration in der EAE und MS. Die vorhandenen Parallelen zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen könnten zur Entwicklung neuroprotektiver Strategien von Nutzen sein und im späteren Stadien als Grundlage zur Entwicklung therapeutischer Strategien in der EAE und MS dienen.



**Abb.3: Hypothese der Wirkungsweise möglicher Versuchs- und Behandlungsansätze**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierversuche

#### 2.1.1 Mäusstämme

Stamm	Geschlecht	Alter	Herkunft
C57/Bl6	Weiblich	2 - 5 Monate	Eigene Zucht Her- tie-Institut für klini- sche Hirnfor- schung
C57/Bl6 CAST- Tg	Weiblich	2 - 5 Monate	RIKEN Brain Science Institute, 21Hirosawa, Wako City Saitama 351-0198, JAPAN
C57/Bl6 CAST- KO	Weiblich	2 – 5 Monate	Provider's Scientist: <b>Nobuhisa IWATA,</b> <b>Ph.D.</b> Laboratory for Proteolytic Neuroscience  Provider's Laboratory Head: <b>Takaomi C. SAIDO,</b> <b>Ph.D.</b>

#### 2.1.2 Rattenstämme

Stamm	Geschlecht	Alter	Herkunft
LEW.1N	weiblich	2 – 5 Monate	Medizinische Hochschule Han- nover
LEW.1AV1	weiblich	2- 5 Monate	Medizinische Hochschule Han- nover

### **2.1.3 Induktion der EAE (Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis)**

Alle tierexperimentellen Versuche wurden vor Versuchsbeginn von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

#### **2.1.3.1 Herstellen eines Inokulums und Immunisierung der Mäuse**

Jede Maus wurde zur EAE Induktion mit Diethylether oder Isofluran anästhesiert und dann mit insgesamt 200µl Inokulum subcutan (s.c.) je 100µl in beide Flanken immunisiert. Das Inokulum bestand aus 50µg MOG-Peptid<sub>35-55</sub> in 100µl PBS gelöst und 100µl komplettem Freund's Adjuvans (CFA), zusammengesetzt aus 100µl inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) und 400µg Mykobakterium tuberculosis (M.t.), und wurde kurz vor Injektion hergestellt.

Zusätzlich wurde nach gängigen Protokollen zum Zeitpunkt der Immunisierung und 48 Stunden nach Immunisierung 150 ng Pertussistoxin gelöst in PBS intravenös in eine Schwanzvene injiziert.

#### **2.1.3.2 Herstellen eines Inokulums und Immunisierung der Ratten**

Jede Ratte wurde zur EAE-Induktion mit Diethylether oder Isofluran anästhesiert und dann mit insgesamt 200µl Inokulum subcutan (s.c.) in die Schwanzbasis immunisiert. Das Inokulum bestand aus 50µg rrMOG<sub>1-125</sub> in 100 µl PBS gelöst, gemischt mit 100µl komplettem Freund's Adjuvans (CFA), zusammengesetzt aus 100µl inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) mit 50µg abgetöteten Mycobakterium tuberculosis, und wurde kurz vor Injektion hergestellt. Bei dem schweren Krankheitsverlauf der LEW.1N Rattenstämme wurde ein Teil der Versuchstiere statt mit kompletten Freund's Adjuvans mit inkompletten Freund's Adjuvans immunisiert, um die Schwere des klinischen Verlaufs abzumildern. Kontrollgruppen wurden mit 100µl PBS gemischt mit 100µl komplettem Freund's Adjuvans (CFA) alleine immunisiert.

#### **2.1.4 Behandlungsschema der LEW.1N und LEW.1AV1-Ratten intraperitoneal (i.p.)**

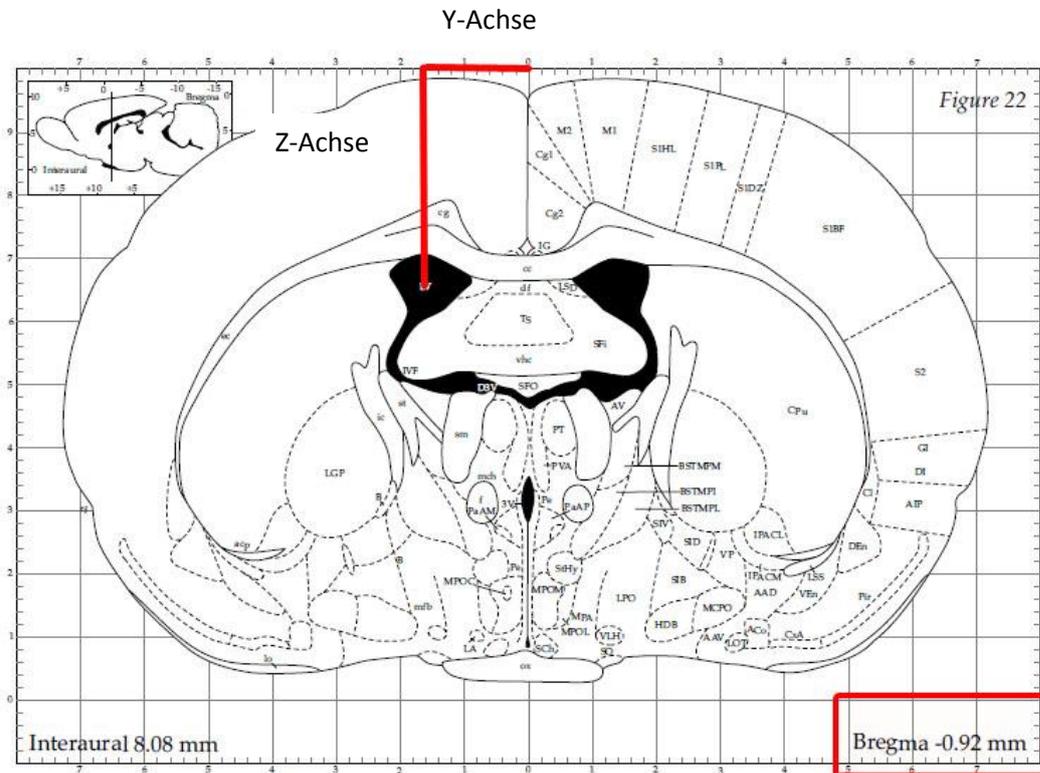
Zur Behandlung der Ratten wurde R-Roscovitine in verschiedenen Versuchen sowohl LEW.1N als auch LEW.1AV1 Ratten intraperitoneal (i.p.) injiziert. Dazu wurden 10mg/kg Körpergewicht R-Roscovitine in 10µl DMSO gelöst und mit 490µl 0,9% NaCl-Lösung vermischt. Die i.p.- Injektion erfolgte ohne Anästhesie der Tiere entweder alle 48 Stunden ab Tag 1 nach Immunisierung bis zum Ende des Experiments oder ab Beginn der klinischen Symptome am Tag 10 und einer 2. Injektion am Tag 14 nach Immunisierung.

Als Kontrolle diente die i.p.-Injektion von 10µl DMSO vermischt mit 490µl 0,9% NaCl nach dem gleichen zeitlichen Injektionsschema. Als 2. Kontrollgruppe dienten Ratten, die mit komplettem Freund´s Adjuvans (CFA) alleine (siehe oben) immunisiert wurden, aber trotzdem eine R-Roscovitine-Behandlung nach obigem Schema erhielten.

#### **2.1.5 Intrathekale (i.t.) Applikation von R-Roscovitine**

Zur intrathekalen (i.t.) Applikation von R - Roscovitine wurden 200µg R-Roscovitine in 25µl künstlichem Liquor (aCSF, 128mM NaCl, 3,0mM KCl, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 23,5 mM NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM Glucose) gelöst und mit Hilfe einer Hamilton-Mikrolitterspritze (Hamilton 30µl und 50µl, Roth) und eines Schlauchsystems in den linken Seitenventrikel der Ratten über 5 Minuten langsam injiziert. Während der ganzen Operation waren die Ratten mit Isofluran (Isoba®) über ein Schlauchsystem mit einer Rattenmaske anästhesiert. Zur Lokalisation des linken Seitenventrikels wurde ein stereotaktischer Atlas des Rattenhirns (*The Rat Brain in stereotaxic Coordinates*, Fourth Edition, George Paxinos & Charles Watson, Academic Press 1998) genutzt. Zur Fixierung der Ratten diente ein stereotaktischer Rahmen mit einem Ratten-aufsatz (David Kopf, USA). Über einen Hautschnitt wurde am Schädel der Ratten das Bregma lokalisiert, das als Orientierung für die Abbildungen des stereotaktischen Atlases diente. Die Eröffnung des Schädels erfolgte dann nach Berechnung der Koordinaten anhand eines koronaren Schnittbildes bezogen auf das Bregma mit Hilfe eines Dentalbohrers unter operationsmikroskopischen

Bedingungen (OPMI, Carl Zeiss), ohne Verletzung der Dura mater. Die Einführung der Nadel erfolgte mit Hilfe eines hydraulischen stereotaktischen Systems (David Kopf, USA) anhand der zuvor dreidimensional berechneten Koordinaten.



**Abb.4: Auffinden des linken Seitenventrikels zur stereotaktischen Operation**

Der Seitenventrikel wurde mit Hilfe des stereotaktischen Atlas des Rattenhirns (*The Rat Brain in stereotaxic Coordinates*, Fourth Edition, George Paxinos & Charles Watson, Academic Press 1998) durch Messung auf einem koronaren Schnittbild, dorsal des Bregmas (X-Achse), lateral des Bregmas (Y-Achse) und der entsprechende Tiefe zum Seitenventrikel (Z-Achse) aufgesucht.

Nach der Injektion wurde die Nadel entfernt, und der Schädel mit Dentalkunststoff verschlossen und kurz getrocknet. Anschließend erfolgte eine Hautnaht und die Ratten wurden in einen separaten Käfig gelegt, um aus der Narkose aufzuwachen und nach Erwachen noch 1 Stunde lang überwacht zu werden. Zur Kontrolle der richtigen Lokalisation wurden vor Versuchsbeginn verschiedene Ratten operiert und künstlicher Liquor (aCSF) injiziert. Danach wurden die Ratten getötet und in histologischen Paraffin - Schnitten mit Hilfe einer H.E.-Färbung der Stichkanal der Injektion nachgewiesen. Diese Einstichkoordinaten wurden für die weiteren Experimente übernommen.

Als Kontrollgruppe dienen Ratten die derselben Operation unterzogen wurden, denen aber 25µl künstlichem Liquor (aCSF) ohne R-Roscovitine injiziert wurde. Aus jeder Gruppe wurde 1 Tier histologisch aufgearbeitet, um den Stichkanal nachzuweisen.



### **Abb.5 - 7: Operatives Setting**

Setting mit Operationsmikroskop (oben links), Stereotaktische Einheit (oben rechts) und Injektionsablauf nach stereotaktischem Einbringen der Injektionsnadel in den linken Seitenventrikel (unten)

### **2.1.6 Beurteilung des Krankheitsverlaufs**

Die Beurteilung der Krankheitsschwere und des Krankheitsverlaufs wurde anhand von täglichen Kontrollen des Gewichts und des klinisch-neurologischen Bildes der Mäuse und Ratten vorgenommen. Zusätzlich spielten noch die Kontrolle des Fells und des Gesamteindrucks eine Rolle. Die Kombination dieser Parameter erlaubt eine Eingruppierung der Tiere in einen bestimmten Krankheitsgrad.

Die klinisch-neurologische Beurteilung wurde anhand motorischer Symptome vorgenommen und ergibt folgende Einteilung von Krankheitsgraden:

Grad 0:	Keine sichtbare Krankheit
Grad 1:	Schwäche des Schwanzes oder Parese des Schwanzes
Grad 2:	Paraparese der Hinterbeine oder Hemiparese
Grad 3:	Paraplegie der Hinterbeine oder Hemiplegie
Grad 4:	Tetraplegie aller Extremitäten
Grad 5:	Tod

### **2.1.7 Vorbereitung der Ratten zum ELISPOT**

Beim Versuchsende wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet und anschließend auf einem Präparationstisch mit Nadeln fixiert. Die ventrale Seite wurde vorsichtig desinfiziert und Abdomen und Thorax wurden durch einen Medianschnitt eröffnet. Nach Darstellung des Herzens wurden die Tiere mit 50 ml PBS perfundiert und die Milz wurde entnommen. Die Milz wurde für den ELISPOT sofort in gekühltes DMEM gegeben und bis zum Beginn des ELISPOT auf Eis aufbewahrt.

### **2.1.8 Vorbereitung der Ratten zum Western Blot**

Bei Versuchsende wurden die Ratten mit CO<sub>2</sub> getötet und anschließend mit 100 ml PBS mit Hilfe einer Perfusionsspritze und einem Butterfly über das Herz perfundiert. Danach wurden sofort das Gehirn und das Rückenmark freipräpariert, Hirnstamm von Großhirn und Kleinhirn getrennt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Zur Verwendung im Westernblot erfolgte eine Homogenisierung von Hirn und Hirnstamm mit Hilfe eines Lysepuffers und eines Gewebshomogenisators zur Zerstörung der Zellen und Gewinnung der zytosolischen Proteine. Dabei wurden 2 Techniken verwendet. Die manuelle Homogenisierung erfolgte in einem Gewebshomogenisator nach *Potter - Elvehjem* (Teflon pistil) mit 1ml eiskaltem Lyse-Puffer pro 100 mg Gewebe. Die mechanische Destruktion erfolgte mit Hilfe einer Gewebemühle mit denselben Lysepuffer-Konzentrationen. Nach der Homogenisierung wurden die Proben in Eppendorfcups gefüllt und bei 14 000 rpm in einer Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Eppendorfcups gefüllt und bei - 25 °C bis zur weiteren Verwendung für Proteinbestimmung nach Bradford und Western- Blot gelagert.

### **2.1.9 Vorbereitung der Ratten zur Histologie und Immunhistochemie**

Bei Versuchsende wurden die Ratten mit CO<sub>2</sub> getötet und anschließend direkt über das Herz mit 100 ml Histofix oder PFA 4% mit Hilfe einer Perfusionsspritze und eines Butterflys perfundiert. Danach wurden sofort das Hirn und das Rückenmark freipräpariert und entnommen. Dabei wurden Hirnstamm und Rückenmark voneinander getrennt. Die Proben wurden weitere 3 Tage in Histofix, oder PFA 4% zur weiteren Fixierung in Falcon-Röhrchen aufbewahrt. Nach 3 Tagen wurden die Proben in neue Falcon-Röhrchen umgelagert und die Flüssigkeit wurde durch PBS ersetzt. Danach erfolgte das Einbetten in Paraffin und das Schneiden in 4 – 8 µm dicke Scheiben nach üblichen Protokollen.

## **2.2 Immunologische und Proteinchemische Methoden**

### **2.2.1 ELISPOT**

Der INF-γ ELISPOT dient dazu T-Zellen aus der Milz quantitativ zu bestimmen, die Interferon γ (INF-γ) produzieren und freisetzen.

Hierzu wird ein spezifischer INF-γ Antikörper (DB-1) auf eine 96 well Platte aufgetragen. Nach Induktion einer EAE mit MOG bilden sich reaktive T-Zellen, die gegenprozessierte MOG-Peptide, die ihrem T-Zell-Rezeptor auf MHC II präsentiert werden, reagieren. Von MOG<sub>1-125</sub> lösen dabei nur bestimmte prozes-

sierte und dem T-Zell-Rezeptor präsentierte Peptidsequenzen einen Immunantwort, bzw. T-Zellklonierung aus. Restimuliert man nun Immunzellen aus der Milz von EAE induzierten Tieren mit den entsprechenden rekombinant hergestellten Antigen-Peptiden (MOG<sub>1-125</sub>, MOG<sub>73-90</sub> und MOG<sub>91-108</sub>), können nur die entsprechenden immunogenen Peptide vom T – Zell-Rezeptor erkannt werden, und nur diejenigen T- Zellen, die spezifisch für das stimulierende Antigenpeptid sind, sezernieren INF- $\gamma$ . Diese T-Zellen können durch Zugabe eines Detektionsantikörpers (DB-12 Biotin) und des entsprechenden Substrats sichtbar gemacht werden.

### Tag 1

Zur Vorbereitung der ELISPOT-Platte wurde der Antikörper DB-1 in einem Beschichtungspuffer auf 10  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100  $\mu\text{l/well}$  pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

### Tag 2

Zu Beginn wurden die Platten per Hand zweimal mit sterilem PBS gewaschen (200  $\mu\text{l/well}$ ). Anschließend wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 200  $\mu\text{l/well}$  komplettes Medium pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Gewinnung der T-Zellen wurden die Milzen der Ratten in 10 ml DMEM durch ein Teesieb zerrieben, mit 10 ml DMEM resuspendiert und bei 1100 rpm 10 min zentrifugiert. Um anschließend die Erythrozyten zu lysieren wurde das Zellpellet mit 5 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Dach folgten insgesamt 3 Waschschriffe durch Resuspension zuerst mit 10 ml und anschließende zweimal mit 15 ml DMEM und jeweils 10 min Zentrifugation bei 1100 rpm. Nach dem 3. Waschschriff wurde das Zellpellet mit 20 ml komplettem Medium resuspendiert und die Zellen wurden durch ein 70  $\mu\text{m}$  Zellsieb gepresst, um Verunreinigungen und Gewebereste zu entfernen.

Im Anschluss wurden die Zellen mikroskopisch gezählt um eine Zellkonzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml einzustellen.

Die Antigene, die zur Stimulation der T-Zellen genutzt wurden (MOG<sub>1-125</sub>/PBS, MOG<sub>1-125</sub>/Acetat, MOG<sub>73-90</sub>/PBS, MOG<sub>91-108</sub>/PBS), wurden in komplettem Medium auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt, während die Positivkontrolle Concanavalin A (ConA) in einer Konzentration von 2,5 µg/ml eingestellt wurde. In jedes well wurden 200 µl der eingestellten Zellsuspension pipettiert und mit 20 µl der Antigen-, bzw. ConA – Lösung über 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### Tag 4

Zu Beginn wurden die Platten viermal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl/well des biotinylierten Antikörpers DB-12 in einer Konzentration von 1 µg/ml dekoriert. Nach einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut viermal mit PBS gewaschen.

Zur Detektion wurde die Vectastatin ABC-Lösung genutzt und je 1 Tropfen der Lösung A und Lösung B in 10 ml PBS gegeben. Von dieser Detektionslösung wurden dann 100 µl/well pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen in PBS wurden 100 µl/well Chromogen-Lösung pipettiert und 8 min bei RT inkubiert. Zum Abschluss wurden die Platten unter fließendem Wasser gewaschen und aufbewahrt. Zur Analyse wurde ein ELISPOT-Reader genutzt.

### **2.2.2 Proteinbestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden in einer 96 well – Platte 10 µl der zu bestimmenden Probe mit 200µl Bradford-Reagenz (Pierce) vermischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur über 5 min wurde die Absorption bei 595nm photometrisch bestimmt. Anhand einer Eichkurve mit BSA (bovines Serum Albumin 2mg/ml) (Pierce) konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

### **2.2.3 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Eine Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte durch eine vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach dem Prinzip von Lämmler (Laemmli, 1970). Dazu wurde ein Mini-PROTEAN Elektrophorese System (Biorad) mit Glasplatten von 10,0 \* 8,1 cm Größe und 1,0 mm Abstand genutzt. Die Endkonzentration von Acrylamid variierte je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine zwischen 14% (w/v) und 10% (w/v). Die Elektrophorese erfolgte für 10 min bei 20 mA und für 1 Stunde bzw. 1 Stunde und 30 Minuten bei 40 mA in einem Tank gefüllt mit 1\* Laufpuffer (5 \* Laufpuffer: 0,125 M Tris-Base, 0,96M Glycine, 0,5 % (w/v) SDS). Nach der Auftrennung wurden die Gele mit Coomassie gefärbt oder zur weiteren Verwendung auf Nitrozellulose oder PVDF-Membranen transferiert.

### **2.2.4 Coomassie-Färbung**

Zur irreversiblen Proteinfärbung der Gele wurde Coomassie-Färbelösung (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Acetat) eingesetzt. Die Gele wurden hierzu in einer Schale vollständig mit der Färbelösung bedeckt und unter Schwenken für 5 – 20 min gefärbt. Zur Entfärbung wurde eine Entfärbelösung (50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Acetat) und Milli – Q – Wasser verwendet. Die Dauer richtete sich nach dem Grad der Entfärbung, so dass die Proteinbande deutlich und kontrastreich auf dem Gel sichtbar waren. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

### **2.2.5 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen (Western-Blot)**

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen können diese Proteine im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung nach dem Elektrottransfer-Verfahren auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen transferiert werden (Towbin et al., 1979). Die PVDF oder Nitrozellulosemembran wurde auf die geeignete Größe, 7,5 \* 10 cm, zugeschnitten und zusammen mit dem Gel, den Gel-Blotting-Papieren (Roth) und mehreren Bögen Whatman-Filterpapier im Transfer-Puffer (39 mM Glycine, 48 mM Tris-Base, 0,0375 % (w/v) SDS, 20

% (w/v) Methanol) eingeweicht. Die PVDF-Membranen wurden zuvor zusätzlich noch für 30 Sekunden in Methanol geschwenkt. Beim Tankverfahren wurde der Proteintransfer in einer speziellen Gel - Kasette (Biorad) durchgeführt. Dabei wurde als unterste Schicht in Richtung der Kathode ein Gel- Blotting- Papier (Roth), dann eine Schicht Whatman-Filterpapier platziert und darauf folgte das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen. Auf das Gel wurde die PVDF- oder Nitrozellulose-Membran gelegt und der Abschluss zur Anode erfolgte wiederum durch eine Schicht Filterpapier und ein Gel- Blotting- Papier. Der Transfer erfolgte in einem speziellen Blot-System (Mini-Transfer Blot Cell, Biorad) vollständig gefüllt mit Transferpuffer, mit Hilfe eines Elektrorührers und Eis über 1 Stunde bei 90 mA pro Membran. (Mini-PROTEAN Tetra cell, Biorad) Nach dem Transfer wurden die Proteine zur Prüfung des Transfererfolgs auf den Membranen mit Hilfe einer reversiblen Färbung durch Ponceau-S-Färbelösung (0,1% (w/v) Ponceau– S, 0,5 % (w/v) Acetat) sichtbar gemacht. Dazu wurden die Membranen in PBS / TWEEN 0,1% (v/v) gewaschen und anschließend für 5 Minuten in der Ponceau-S-Färbelösung geschwenkt. Überschüssige Färbelösung wurde nach den 5 Minuten mit entsalztem Wasser abgewaschen, so dass die gefärbten Proteinbanden sichtbar gemacht werden konnten.

### **2.2.6 Dekoration der Western-Blot-Membranen mit Antikörpern**

Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die PVDF- und Nitrozellulosemembranen nach dem Proteintransfer und der reversiblen Färbung mit Ponceau-S-Färbelösung 3 \* 5 min in PBS/TWEEN gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit PBS/TWEEN 5% (w/v) Magermilchpulver blockiert. Nach dem Blockieren wurde wieder 3\* 5 min in PBS/Tween gewaschen und anschließend mit einem spezifischen 1. Antikörper über 60 Minuten dekoriert, wobei Antikörper-Verdünnungen zwischen 1:25 bis 1:1000 in PBS/TWEEN 1% (w/v) Magermilchpulver genutzt wurden.

Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde nach der Dekoration wieder 3 \* 5 min in PBS/TWEEN gewaschen und anschließend mit einem 2. Antikörper gegen das Immunglobulin G von Maus (Hase oder Ziege), der mit Meerrettich-

Peroxidase gekoppelt war (Ziege anti-Maus-HRP Konjugat (Firma)) über 60 min inkubiert. Dazu wurden die 2. Antikörper 1:5000 bis 1:10000 in PBS/TWEEN 1% (w/v) Magermilchpulver verdünnt.

Anschließend wurde erneut 5 \* 5 min in PBS/TWEEN gewaschen und die gebundene Peroxidase wurde mit 2 verschiedenen Detektionssystemen, die auf dem Prinzip der Chemolumineszenz beruhen (Super Signal Chemiluminescent Substrat; Pierce, bzw. Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat; Millipore) dargestellt. Dazu wurden die beiden Lösungen der Detektionssysteme A und B unmittelbar vor der Reaktion im Verhältnis 1:1 zusammengemischt und bei Raumtemperatur nach Herstelleranleitung für 5 min inkubiert. Die antikörper-dekorierten Membranen wurden nach dem Waschen für 5 min mit der Lumineszenz-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend sofort in einer Dunkelkassette zwischen 5 Sekunden und 20 Minuten einem Röntgenfilm (Amersham Bioscience) ausgesetzt. Zur Entwicklung wurde ein Filmentwicklungsgerät von Fuji verwendet.

### **2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von DNA kann mit Hilfe eines Photospektrometers bestimmt werden. Dazu wurde die Extinktion der DNA – Lösungen bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) gemessen. Bei  $OD_{260}$  entspricht eine Extinktion von 1, 50 $\mu$ g/ml doppelsträngiger und 33 $\mu$ g/ml einzelsträngiger DNA. Verunreinigungen durch Proteine wurden durch den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei  $OD_{280}$  liegt. Bei Quotienten kleiner 1,7 wurde die Probe als verunreinigt gewertet.

#### **2.3.2 DNA- Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Ziel der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die Vermehrung einer bekannten DNA – Sequenz in einer Probe. Durch das wiederholte Durchlaufen eines bestimmten Reaktionszyklus, bestehend aus Trennung der Matritzenstränge, Anlagerung von spezifischen kurzen Oligonukleotiden (Primern) an den Matritzenstrang, Verlängerung der Primer durch eine thermostabile DNA – Polymera-

se, kann eine exponentielle Vervielfältigung der Matrizen-DNA erzielt werden (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988).

Pro Ansatz wurde 12,5 µl PCR Mastermix verwendet, je 0,5 µl Forward und Reverse Primer und 7,5 µl Milipore Wasser. Zu diesem Ansatz wurden 4µl der 1:10 verdünnten DNA gegeben. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers in einer 96 well – Platte.

Ein typischer Reaktionsverlauf begann mit einer 5 minütigen Denaturierung bei 95°C, um die Matrizenstränge vollständig zu trennen. Danach schlossen sich 25 – 40 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95° C, Anlagerung der Primer für 30 Sekunden bei 56 °C und anschließender DNA- Synthese durch die thermostabile Taq-Polymerase aus *Thermus auqaticus* bei einem Temperatur-Optimum von 72° C über 30 Sekunden an. Abschließend folgte eine finale DNA – Synthese über 5 Minuten bei 72 °C und ein Abkühlen des Produkts auf 4 °C. Die Entstehung des entsprechenden Produkts wurde anschließend im Agarosegel kontrolliert.

### **2.3.3 Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen**

Die Reinigung und Entsalzung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe von Mikrozentrifugationssäulchen (Qiaquick PCR Purification Kit) nach Herstelleranleitung. Dazu wurde das PCR Produkt zunächst mit 5 Volumina Puffer PB verdünnt. Zur Bindung an den Säulen wurde diese Lösung für 1 min bei 14 000 rpm einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und nach dem gleichen Vorgehen wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Nach dem Verwerfen der Waschlösung wurde erneut zentrifugiert, um die Reste der Waschlösung vollständig zu entfernen. Die DNA konnte dann mit 50 µl sterilem Wasser eluiert werden.

### **2.3.4 Agarose- Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung der DNA- Fragmente nach ihrer Größe, wobei kleinere DNA - Fragmente schneller und weiter wandern als größere DNA- Fragmente. Für die Auftrennung wurden Agarosegele verwendet, die je nach DNA - Fragmentgröße 1,2 % - 1,5 % (w/v) Agarose enthielten.

Als Längenstandard wurde eine 1kB Plus DNA- Ladder benutzt und als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Die Agarose wurde in einem Erlenmeyer-Kolben abgewogen und entsprechend in TBE-Puffer gelöst und anschließend in der Mikrowelle aufgekocht. Nach kurzer Abkühlungszeit wurden 5µl Ethidiumbromid beigefügt und die Gele wurden in passende Gelkammern gegossen.

Zum Auftragen der Proben wurden 10 µl Probe mit 2µl Ladepuffer vermischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte mit einer Feldstärke von 15 V/cm. Anschließend konnten die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA- Banden mit UV – Licht sichtbar gemacht und abfotografiert werden.

### **2.3.5 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* (TOP10)**

Elektrokompetente *E. coli* wurden auf Agar-Platten angezüchtet. Zum erstellen einer Vorkultur wurde eine Kolonie gepickt und in 50 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C unter permanentem Schütteln inkubiert. 10 ml der Vorkultur wurden in 1 Liter LB – Medium gegeben und inkubiert bis die OD<sub>600</sub> ca. 0,5 betrug.

Alle weiteren Schritte wurden unter ständiger Kühlung mit Eis und mit gekühlten Medien durchgeführt. 1 Liter der Bakterienkultur wurde für 25 Minuten bei 4200 rpm und 2°C zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden mit 10 ml 10 % (v/v) auf 4°C vorgekühltem Glycerol resuspendiert und vereinigt. Daraufhin wurden die Zellen nacheinander mit 500 ml, 250 ml und schließlich 50 ml 10% (v/v) Glycerol gewaschen und nach jedem Waschschrift für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das letzte Pellet wurde mit 1,5 ml 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert und anschließend in 100µl Aliquots abgefüllt. Die Aliquots wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

### **2.3.6 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Die Transformation der kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden die Aliquots der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 45 µl der Zellen wurden mit 5 – 10 µg des Plasmids versetzt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend wurden die Zellen in einem Elektroporationsge-

rät mit 1,5 V und 800  $\Omega$  transformiert. Sofort nach der Elektroporation wurde dem Ansatz 1 ml S.O.C. Medium zugegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, um die Ampicillin-Resistenz auszubilden. Nach der Inkubation wurden 10  $\mu$ l der Bakterienkultur mit dem enthaltenen Plasmid auf eine Ampicillin-Agar-Platte ausplattiert und die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### **2.3.7 Restriktionsverdau der CIP-Plasmide**

Die Plasmidpräparation wurde mittels QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. 5  $\mu$ g des Plasmids wurden mit 1  $\mu$ l XhoI, 1  $\mu$ l EcoRI und 1  $\mu$ l Puffer H (pcDNA.3.1) bzw. mit 1  $\mu$ l Puffer A, 1  $\mu$ l BamHI und 1  $\mu$ l EcoRI (pGEX 4T-2) gemischt, mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 10  $\mu$ l aufgefüllt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurde der Ansatz für 15 min auf 65 °C erhitzt. Die Aufreinigung erfolgte mittels QIAquick PCR Purification Kit (siehe oben)

### **2.3.8 Sequenzierung**

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) mit fluoreszierenden ddNTPs. Es wurden 500 -700 ng des zu sequenzierenden Plasmids mit 2  $\mu$ l Big Dye v.3.1, 1  $\mu$ l 5\*Puffer und 0,5  $\mu$ l Sequenzierungsprimer (100pmol/ $\mu$ l) vermischt und daraufhin mit sterilem Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l aufgefüllt. Die PCR zur Sequenzierung erfolgte nach folgendem Programm:

1. 94°C für 1 min
2. 94°C für 10 sec
3. 50°C für 5 sec
4. 60°C für 4 min
5. Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 29 Zyklen

Das erhaltene Produkt wurde durch eine Ethanol-fällung gereinigt. Zum gewonnenen Ansatz wurde 1  $\mu$ l 3M NaAc pH 4,8 und 25  $\mu$ l Ethanol pipettiert, dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 45min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde zweimalig 15 min bei 13000 rpm mit 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand

wurde erneut verworfen. Nach 15minütiger Trocknung des Niederschlags bei Raumtemperatur wurde er erneut in 15µl Aqua dest. gelöst. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von der AG Gasser im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung durchgeführt.

### **2.3.9 CIP (CDK5 Inhibitor Protein) Expression in E. coli Bakterien**

Zur Expression des CIP, wurde mit Hilfe der Plasmid-transformierten E. coli eine Kultur angelegt (s.o.) Von der Agarplatte wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Kolonie gepickt und in 4 - 5 ml LB-Medium mit Ampicillin eingebracht. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 190 rpm und 37°C vorinkubiert. Aus diesen Kulturen wurden zur Aufbewahrung und zur weiteren Verwendung Glycerolstocks hergestellt, indem 500µl der Übernachtskultur mit 500µl Glycerol gemischt wurden und bei -80°C gelagert wurden.

Aus dem Glycerolstock wurden erneut unter sterilen Bedingungen mit dem Zahnstocher Kolonien in 5 ml LB Medium eingebracht und bei 37°C über Nacht, wie oben beschrieben inkubiert.

Zur Induktion des CIP wurde IPTG verwendet. 100µl der Vorkultur wurden hierzu in 900µl LB-Medium + Ampicillin gegeben und erneut für 2h bei 190 rpm vorinkubiert. Daraufhin wurde IPTG in einer Konzentration von 1mM zu den Proben hinzugefügt und für weiter 2 - 4 h bei 37°C und 190 rpm inkubiert.

Zur Expressionskontrolle wurden die Kulturen dann bei 8000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden daraufhin in je 10 ml PBS gelöst und erneut mit 4600 rpm zentrifugiert. Die Bakterienpellets mit exprimierten CIP wurden bei -80°C aufbewahrt.

Zur Expressionskontrolle wurden die Bakterien 3\* auf 37°C aufgetaut und wieder auf -20°C eingefroren, daraufhin mit 50µl eiskaltem 1\* PBS pro ml Zellkultur gelöst und mit Ultraschall nach Herstellerangaben in kurzen Schocks lysiert. Zu dieser Lösung wurde 20% Triton X zu einer Gesamtkonzentration von 1% (v/v) gegeben und für 30 min gemischt. Daraufhin wurden die Mischung für 10 min bei 4°C und 12 575 rpm zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung vorsichtig gewonnen.

Hieraus wurde zur Kontrolle der Expression eine Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und mit einem entspre-

chenden Marker die erwartete Größe des CIP-Proteins durch eine sehr starke Bande bei 38,5 kDa im Vgl. zu nicht IPTG induzierten Kontrollen nachgewiesen.

### **2.3.10 CIP(CDK5 Inhibitor Protein) Reinigung**

Zur Aufreinigung des induzierten CIP-Proteins aus den CIP-GST Vektor E.coli-Bakterien wurden die bei -80 °C gelagerten Zellpellets 3\* bei 37°C aufgetaut und in einer Mischung aus Trockeneis und Isopropanol (ca. -20°C) wieder eingefroren. Danach wurden die Zell- Pellets mit 50 ml eiskaltem PBS pro Liter Zellkultur resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall über 10 min mit kurzen Schallfolgen lysiert. Danach wurde 20% Triton-X zu einer Endkonzentration von 1% (v/v) hinzugefügt und für 20 min durchmischt. Anschließend wurde die Lösung bei 12 575 rpm in einer Ultrazentrifuge (Soren) zentrifugiert und der Überstand in frische Falcon-Gefäße umgefüllt.

Die Reinigung erfolgte über eine Säule aus Sepharose 4B die nach Herstellerprotokoll zu einer 50%-Konzentration verdünnt wurde. Dabei wurden 0,5 ml der 50% Sepharose 4B für 50 ml Zellsuspension genutzt und 30 min bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Danach wurde die Lösung in eine leere Säule gefüllt und nach Absetzen des Mediums in der Säule, die Säule geöffnet und der Durchfluss verworfen. Darauf folgten 3 Waschschrte mit eiskaltem PBS mit dem 10fachen Sepharose 4B Säulenvolumen. Nach dem Waschvorgang wurde die Säule geschlossen.

Zur Eluierung und Abspaltung des GST-Proteins von der Säule wurde die Proteingebundene Säule erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit 80µl Thrombin (Thrombin 500 U) auf 920 µl PBS pro ml Sepharose 4B überschichtet. Die Darauf folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur zwischen 2 und 16 Stunden (22 – 25 °C) und im Anschluss wurde die Säule mit 3 \* dem Sepharose 4 B Volumen an auf 4 °C gekühltem PBS eluiert und das Eluat in verschiedenen Gefäßen aufgefangen. Das Thrombin wurde gleich im Anschluss durch eine Säulenreinigung durch eine Benzamidine Agarose enthaltende Säule vom eluierten Protein getrennt.

## 2.4 Histologische Methoden

### 2.4.1 Histologische Färbungen

Zur histologischen Aufarbeitung wurden die Ratten mit CO<sub>2</sub> getötet und anschließend direkt über das Herz mit 100 ml Histofix oder PFA 4% mit Hilfe einer Perfusionsspritze und eines Butterflys perfundiert. Danach wurden Hirn und Rückenmark freipräpariert und entnommen. Die Proben wurden weitere 3 Tage in Histofix, oder PFA 4% zur weiteren Fixierung in Falcon-Röhrchen aufbewahrt. Nach 3 Tagen wurden die Proben in neue Falcon-Röhrchen umgelagert und die Flüssigkeit wurde durch PBS ersetzt. Danach erfolgte das Einbetten in Paraffin und das Schneiden in 4 – 8 µm dicke Scheiben nach üblichen Protokollen.

Zur histologischen Färbung wurden die Schnitte manuell mit einer absteigenden Alkoholreihe nach folgendem Protokoll entparaffiniert

Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
100% Alkohol	3 min
100 % Alkohol	2 min
96 % Alkohol	2 min
96 % Alkohol	2 min
70 % Alkohol	2 min
spülen in Aqua dest	

und danach eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) nach folgendem Ablauf durchgeführt.

Hämalaun nach Mayer	3-5 min
Bläuen in Leitungswasser	5 min
Eosin	2 min
Spülen in Aqua dest	
70 % Alkohol	2 min
96 % Alkohol	2min
96 % Alkohol	2 min
100 % Alkohol	2 min

100 % Alkohol	3 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

Danach wurden die gefärbten Schnitte auf den Objektträgern eingedeckt und mikroskopisch beurteilt.

### 2.5 Reagenzien

1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
2 – Mercaptoethanol	Roth
10* Puffer H für Restriktionsenzyme	Roche
AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)	Sigma
Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Antarktische Phosphatase 5U/μl	
BAM HI 10 U/μl	Roche
Benzamidinhydrochlorid Hydrat	Sigma
Bluejuice Ladepuffer	Invitrogen
Bradford-Reagenz	Pierce
Brilliant Blau G250	Roth
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth
CFA (complete Freund´s Adjuvant)	Sigma
Complete®- Proteinaseinhibitor Mix	Roche Diagnostics
Coomassie	
Diethylether	Riedel de Haen
DMEM	GIBCO
DMSO	
D- PBS	GIBCO
DNTPs (100mM each)	Amersham Bio- science

Dual Color Protein Standard	Bio-Rad
EcoRI 10 U/ $\mu$ l	Roche
EGTA	Sigma
EDTA	Roth
Elektrokompetente E.coli (TOP10)	Invitrogen
Erythrosin	
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Roth
Formaldehyd	Roth
Glycerol 87%	Merck
Glycin	Roth
Guadinin HCl	Roth
Hämalaun nach Mayer	
Harnstoff	Roth
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	Fluka
HCl	Roth
HEPES	Fluka
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Millipore
Isofluran (Isoba®)	Essex Tierarznei
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
KHCO <sub>3</sub>	Roth
LB-Broth (powder)	Sigma
L-Gluthathion reduziert	Sigma
Lysozym Hühnereiweiß	Roth
Magermilchpulver	Roth
MgCl <sub>2</sub>	Roth
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumcitrat	Roth
NaCl	Merck
NaCl-Lösung 0,9%	Fresenius Kabi

NaF	Sigma
NaOH	Roth
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma
P- Aminobenzamidine	Sigma
PCR Master Mix	Promega
Ponceau-S	Roth
Prestained Proteinmarker	New England Bio- labs
Rotipherese®NF-Acrylamid/Bis	Roth
R – Roscovitine	A.G. Scientific / MoBiTec- GmbH
SDS	Fluka
SDS Ultrapur	Sigma
S.O.C Medium	Invitrogen
Super Signal Chemiluminescent Substrat	Pierce
TEMED	Roth
Tris-Base	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton-X -100	Sigma
Tween 20	Roth
Xho I 10U/μl	Roche
Xylol	

### **2.6 Kits**

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning	Invitrogen
Vectastatin ABC Kit	Linaris

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Antikörper für Elispot

DB-1	Eigene Herstellung
DB-12 Biotin	U-CyTec

### 2.7.2 Antikörper für Western-Blot und Immunhistochemie

#### 2.7.2.1 Anti-Tau Antikörper

Tau 5 (monoklonaler Mausantikörper)	Chemicon International
Tau 5 (monoklonaler Mausantikörper)	BD Biosciences
AT 8 (monoklonaler Mausantikörper)	Innogenetics / Autogen Bioclear
AT 100 (monoklonaler Mausantikörper)	Innogenetics / Autogen Bioclear
AT 180 (monoklonaler Mausantikörper)	Innogenetics / Autogen Bioclear
Tau-PHF1, Tau-TG3 (monoklonale Mausantikörper)	Peter Davies (Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA)

#### 2.7.2.2 Sonstige Antikörper

p 35 (C-19): sc-820 (monoklonale Mausantikörper)	Santa Cruz Bio- technology
Anti-cdk5 (monoklonale Mausantikörper)	Santa Cruz Bio- technology

Anti- Actin (monoklonale Mausantikörper)

Santa Cruz Bio-  
technology

## 2.8 Plasmide

pGEX-4T2

Amersham  
Biosciences /  
GE healthcare

pcDNA 3.1/ HIS C

Invitrogen

CIP - pGEX-4T2

Niranja Amin, Ph.D  
(Dr. Harish C. Pant,  
Laboratory of Neuro-  
chemistry, National  
Institute of Neurological  
Disorders And Stroke,  
Bethesda, USA)

CIP - pcDNA 3.1/ HIS C

Yali Zheng, Ph.D  
(Dr. Harish C. Pant,  
Laboratory of Neuro-  
chemistry, National  
Institute of Neurological  
Disorders and Stroke,  
Bethesda, USA)

## 2.9 Sequenzierprimer

pGEX forward

CACAAGCTGTGACCGTCTCC

pGEX reverse

GGATGCGTTCCCAAATTAG

pcDNA forward

CCAAGCTGGCTAGCGTTTA

pcDNA reverse

AGGAAAGGACAGTGGGAGTG

## 2.10 Chirurgisches Material

Anatomische Pinzette	Aeskulap
Chirurgische Schere, gebogen 16,5 cm	Aeskulap
Chirurgische Schere, gerade 16,5 cm	Aeskulap
Chirurgische Schere, gerade	Aeskulap
Einmalskalpelle	BD Braun
Chirurgisches Nahtmaterial	
Teesieb	Fakelmann
Operationsmikroskop OPMI MDM	Carl Zeiss
Stereotaktischer Rahmen	David Kopf, USA
Hydraulischer Mikropositionierer Modell 640	David Kopf, USA
Dentaltechnikbohrer	

## 2.11 Puffer und Medien

### ACK-Lysepuffer

- 0,15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 10 mM  $\text{KHCO}_3$
- 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$
- pH 7,2 – 7,4

### aCSF

- 128mM NaCl
- 3,0mM KCl
- 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$
- 1 mM  $\text{MgSO}_4$
- 23,5 mM  $\text{NaHCO}_3^-$
- 0,5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 30 mM Glucose

### 5 \* Annealing Puffer

500 mM KAc  
30 mM HEPES  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

### Beschichtungspuffer

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>  
pH 8,2

### Chromogen Lösung

10 mg ACE (3-amino-9-ethylcarbazol) in  
1 ml Dimethylformamid  
30 ml 0,05 M NaAc (pH 4,9)  
20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)  
steril filtriert

### Eiskalter Lysepuffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
150 mM NaCl  
20 mM NaF  
1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
2 mM EGTA  
0,5 % (v/v) Triton X-100  
0,1 % (w/v) SDS  
+ 40µl complete® (Roche Diagnostics) / ml Lysepuffer

### Komplettes Medium

DMEM  
5 % FCS  
1% PSGlu  
50 µm 2-Mercaptoethanol

### Ladepuffer 2\*

50 mM Tris – HCl, pH 6,8  
1% (w/v) SDS  
1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol  
10 % (v/v) Glycerol  
0,005 % (w/v) Bromphenolblau  
Aufbewahrung bei - 20 °C

### Laufgel-Puffer

1,87 M Tris-Base, pH 8,8  
0,5 % (w/v) SDS

### Laufpuffer 5\*

0,125 M Tris – Base  
0,96 M Glycine  
0,5 % (w/v) SDS

### LB – Medium

10 g Pepton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
15 g Agar  
pH 7,0  
Ampicillin: Endkonzentration 100 µg/ml

### Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris – Base, pH 6,8  
0,5 % (w/v) SDS

1 \* TBE – Puffer

89 mM Tris-Base  
89 mM Borsäure  
20 mM EDTA  
pH 8,0

Transferpuffer

39 mM Glycine  
48 mM Tris – Base  
0,0375 % (w/v) SDS  
20 % (w/v) Methanol

**2.12 Materialien**

Crystal seal	Abgene
Einmalskalpell	BD Braun
Elektroporationsküvetten 4 mm	Peqlab
Filme	Amersham Bio- sciences
Küvetten für UV B	Braun
Kryoröhrchen	nunc
Nylonmembran	Roth
Petrischalen	VWR
Pipettenspitzen	Sarstedt
Röhrchen für Bakterienkultur (12 ml, steril)	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf
RT-PCR 96-Loch Platten AB-0600	Abgene
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Becton Di- ckinson

### 2.13 Geräte

ABI prism 7000 sequence detection system	Applied Biosystems
Elektroporationsgerät	BioRad
Entwicklermaschine	FUJI
Feinwaage	Satorius
Filmkassette	VWR
Fotomikroskop	Carl Zeiss
Gelkammern	Peqlab
Gewebemühle	Qiagen
Homogenisator	VWR
Laborwaage	Kern
Magnetrührer MR 3000	Heidolph
Mini-Trans Blot Cell	Biorad
Mini-PROTEAN Tetra cell	Biorad
Ph-Meter	Schott
Pipetten	Gilson
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe	Hirschmann
PTC-200 PCR	MJ-Research
Thermoblock 2-2503	neoLab
Thermosealer	Adv. Biotechnologies
Tischzentrifuge bis 2 ml	5417R Eppendorf
Tischzentrifuge bis 50 ml Multifuge 3 S-R	Heraeus
UV-Spektrometer	Eppendorf
UV-Visualisierer	Pharmacia Biotech
Vortexer	neoLab
Vortexer	Scientific Industries
Wasserbad	VWR

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Induktion einer EAE in verschiedenen Rattenstämmen

Die folgenden Experimente dienten der Induktion einer EAE in verschiedenen Rattenstämmen, der klinischen Evaluation des Krankheitsverlaufes und in einem weiteren Schritt dem Nachweis von phosphoryliertem Tau-Protein als möglichem Hinweis einer Axondegeneration in der EAE.

Hierzu wurden jedem Tier am Tag 0 200µl eines Inokulums, wie in Material und Methoden beschrieben, bestehend aus 50µg rrMOG<sub>1-125</sub> in komplettem Freund´s Adjuvans (inkomplettes Freund´s Adjuvans mit 50µg Mycobakterium tuberculosis) subcutan an der Schwanzbasis appliziert.

Der Krankheitsverlauf und das Körpergewicht wurden dann kontinuierlich nach folgendem Schema beurteilt und dokumentiert.

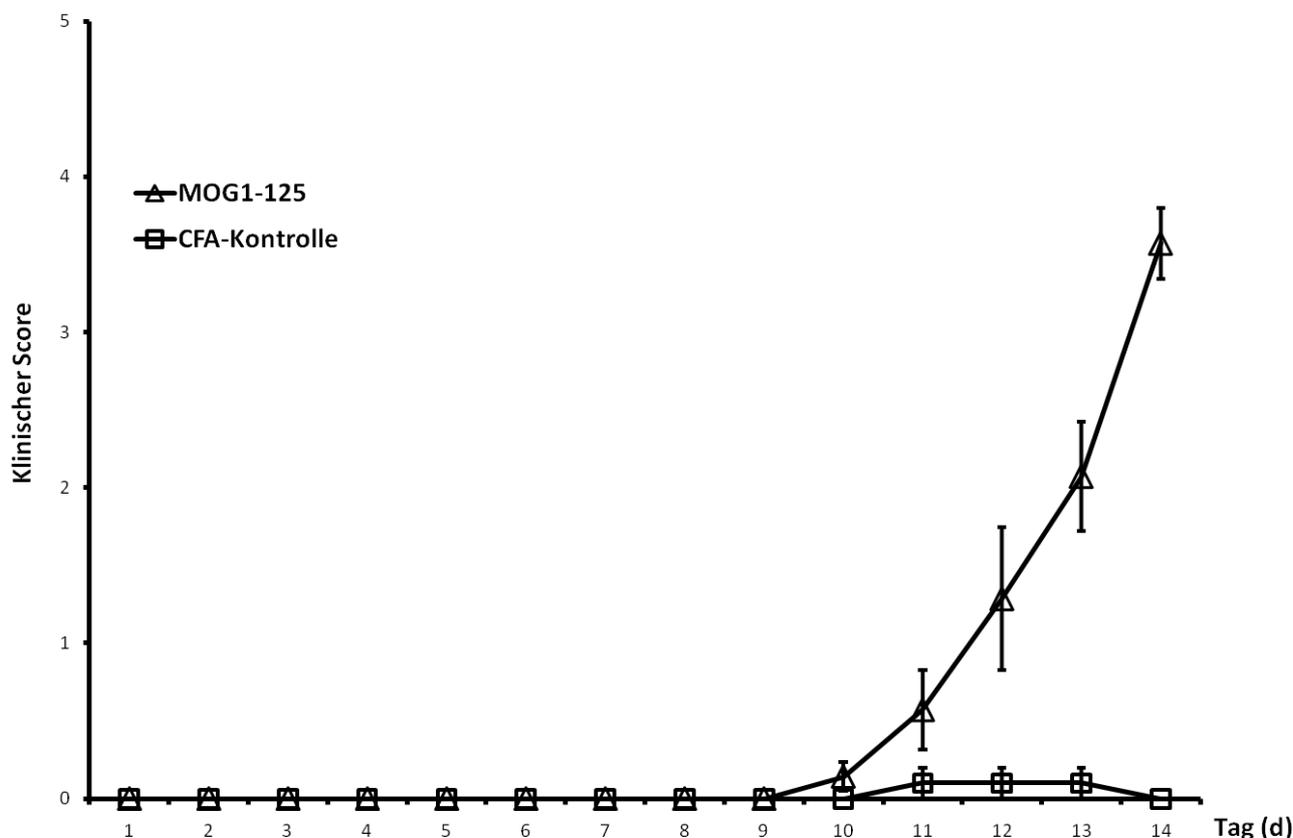
Grad 0:	Keine sichtbare Krankheit
Grad 1:	Schwäche des Schwanzes oder Parese des Schwanzes
Grad 2:	Paraparese der Hinterbeine oder Hemiparese
Grad 3:	Paraplegie der Hinterbeine oder Hemiplegie
Grad 4:	Tetraplegie aller Extremitäten
Grad 5:	Tod

Es wurden auch halbe Grade vergeben. Als krank wurde ein Tier definiert, das an mehr als 2 aufeinanderfolgenden Tagen einen Score von 0,5 oder mehr zeigte.

In allen Versuchen wurden die Daten der einzelnen Gruppen ohne Rücksicht auf externe Einflüsse (z.B. unterschiedliche Tierpfleger, unterschiedliche Temperatur im Tierstall) bewertet und berechnet.

Zur statistischen Auswertung wurde die Area under the Curve (AUC) mit der Trapezregel bestimmt und für die einzelnen Gruppen bei 2 Gruppen mit dem Student´schen T-Test, bei mehr als 2 Gruppen mit einem ANOVA-Test (Analysis of Variance) auf Signifikanz geprüft. Alpha wurde dabei auf 0,05 festgelegt.

### 3.1.1 Induktion einer EAE bei LEW.1N Rattenstämmen



**Abb. 8: Krankheitsverlauf nach Induktion einer EAE bei LEW.1N Rattenstämmen**

Auf der X-Achse sind die Tage nach Immunisierung aufgetragen, auf der Y-Achse die Schwere des Krankheitscores. Die Immunisierung wurde am Tag 0 durchgeführt. Die beiden Gruppen waren LEW.1N Ratten mit  $MOG_{1-125}$  ( $n=7$ ) immunisiert und LEW.1N Ratten als Kontrolle mit CFA immunisiert ( $n=5$ ). Die Kurve mit dreieckiger Markierung zeigt den Krankheitsverlauf der MOG immunisierten Tiere ( $\pm$  SEM) (Standard Error of the Mean), die Kurve mit viereckiger Markierung den Krankheitsverlauf der Kontrolltiere ( $\pm$  SEM).

Wie in Abb.8 zu sehen ist wurde bei den LEW.1N Ratten, wie schon in mehreren Arbeiten zuvor beschrieben, durch die einmalige Immunisierung mit  $MOG_{1-125}$  eine schwerer Krankheitsverlauf ausgelöst, der nach 12-14 Tagen zu einer starken neurologischen Beeinträchtigung führte und bei Versuchsende einen Score zwischen 2,5 und 4 aufwies. Von den 7 Versuchstieren erkrankten alle MOG induzierten Tiere, wohingegen von den CFA Kontrollen keines der 5 Tiere erkrankte. Der max. Mittelwert des klinischen Scores betrug bei den MOG immunisierten Tieren 3,57 ( $\pm$  0,6 SD (standard deviation)), wohingegen bei den

CFA Kontrollen ein maximaler Mittelwert von 0,17 (+/- 0,22) ermittelt werden konnte. Der mittlere Krankheitsbeginn der EAE lag bei 10 Tagen (+/- 0,76 SD)

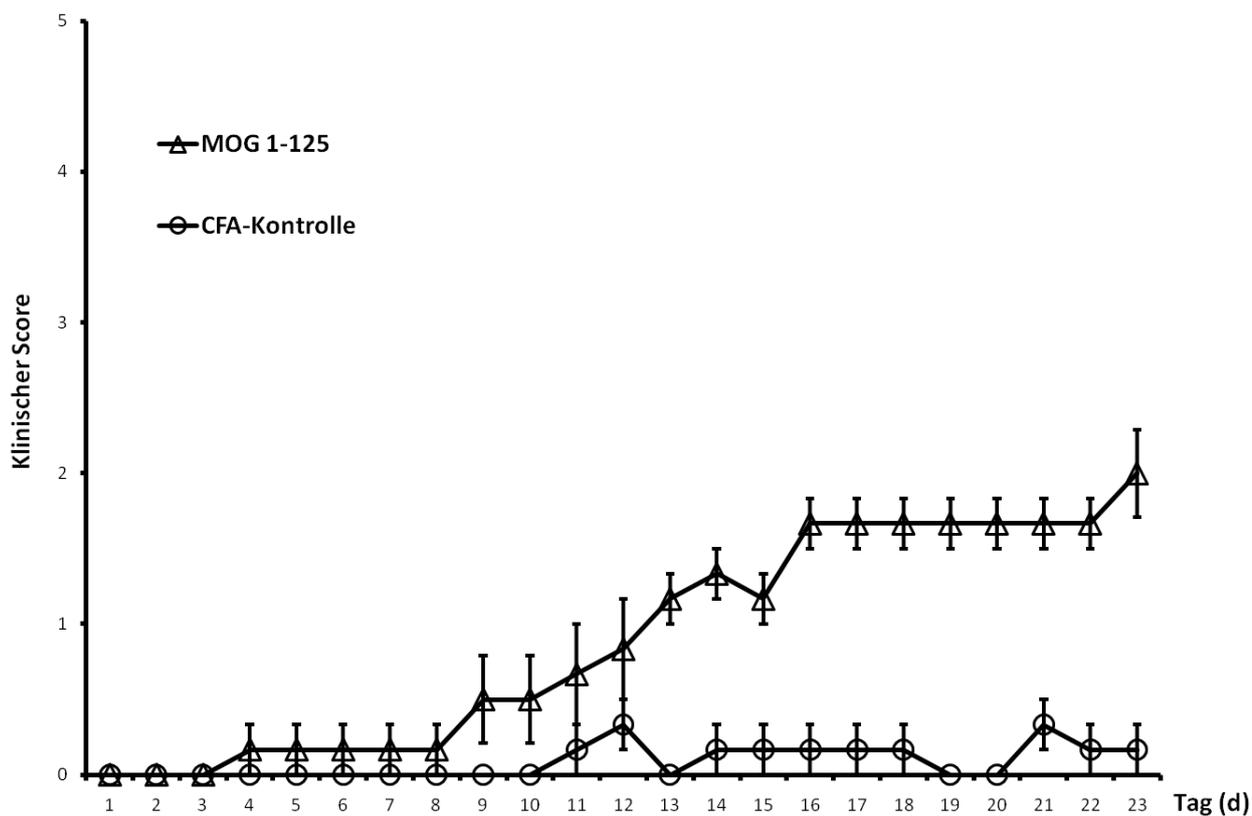
Stamm	Immuni- sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Score MEAN	Standard- abweichung (+/- SD)	Tag des Krankheits- eintritts (+/- SD)
LEW. 1N	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	keine	7	7/7	3,57	+/- 0,6	10 (+/- 0,76)
LEW. 1N	100µl PBS + 100 µl CFA	keine	5	0/5	0,17	+/- 0,22	10 (+/- 0)

**Tab.1: Deskriptive statistische Werte der EAE Induktion bei LEW.1N Ratten**

Im Vergleich der AUCs zeigt sich im Student´schen T-Test ein p Wert von 0,002 und damit ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

### 3.1.2 Induktion einer EAE bei LEW.1AV1 Rattenstämmen

Abb. 9 zeigt die Induktion einer EAE bei LEW.1AV1 Ratten. Die Immunisierung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben mit MOG<sub>1-125</sub> (n=3) oder CFA alleine bei den Kontrolltieren (n=3). Insgesamt zeigte sich ein deutlich milderer Krankheitsverlauf als bei den LEW.1N Ratten mit einem mittleren maximalen Krankheitsgrad von 2,5 (+/- 0,5 SD) und einer geringeren Gewichtsabnahme. Am Versuchsende betrug der Krankheitsscore zwischen 1,5 und 2,5, wohingegen der Krankheitsscore bei den Kontrolltieren lediglich bei einem Tier mit 0,5 bewertet wurde. Alle 3 Tiere erkrankten nach der Immunisierung mit MOG<sub>1-125</sub> an einer EAE, der Krankheitsbeginn war im Mittel am Tag 7,33 (+/- 4,04 SD) und zeigte nur ein langsames Fortschreiten der klinischen Symptomatik.



**Abb.9: Krankheitsverlauf nach Induktion einer EAE bei LEW.1AV1 Rattenstämmen**

Auf der X-Achse sind die Tage nach Immunisierung aufgetragen, auf der Y-Achse die Schwere des Krankheitscores. Die Immunisierung wurde am Tag 0 durchgeführt. Die Gruppen waren LEW.1AV1 Ratten mit MOG<sub>1-125</sub> (n=3) immunisiert und als Kontrollgruppe LEW.1AV1 Ratten mit CFA allein immunisiert (n=3). Die Kurve mit dreieckiger Markierung zeigt den Krankheitsverlauf der MOG immunisierten Tiere (+/- SEM), die Kurve mit viereckiger Markierung den Krankheitsverlauf der Kontrolltiere (+/- SEM)

Stamm	Immuni-sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Score MEAN	Standard-abweichung (+/- SD)	Tag des Krankheits-eintritts (+/- SD)
LEW. 1AV1	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	keine	3	3/3	2,5	+/- 0,5	7,33 (+/- 4,04)
LEW. 1AV1	100µl PBS + 100 µl CFA	keine	3	0/3	0,33	+/- 0,29	10,5 (+/- 1,41)

**Tab. 2: Deskriptive statistische Werte der EAE Induktion bei LEW.1AV1 Ratten**

Auch die MOG Immunisierung bei den LEW.1AV1 stämmigen Tieren zeigte einen signifikanten Unterschied des Krankheitsverlaufes im Vergleich zu den CFA Kontrollen, berechnet durch den Vergleich der AUC´s der beiden untersuchten Gruppen ( $p = 0,01$ ).

### **3.2 Nachweis von phosphoryliertem Tau, CDK5 und p35/p25 bei der MOG induzierten EAE bei den Rattenstämmen LEW.1N und LEW.1AV1**

Zum Nachweis von phosphoryliertem Tau wurden die EAE induzierten Tiere nach 14, bzw. 25 Tagen getötet und wie in Material und Methoden unter 2.1.8 beschrieben zur proteinbiochemischen Untersuchung vorbereitet. Dazu wurden den Tieren Gehirn und Hirnstamm entnommen und durch Gewebemodernisierung und Lyse zum Western Blot vorbereitet. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und dann nach dem Blotting auf eine Nitrozellulose Membran mit verschiedenen Antikörpern gegen hyperphosphoryliertes Tau (Tau5, AT8, AT100, AT180, PHF1), CDK5 (Anti-CDK5), bzw. p35/p25 (C19) dekoriert.

Die Blots wurden bei jedem einzelnen Tier der MOG induzierten Tiere gegen die CFA Kontrollen aufgetragen. Es wurden aber auch gemischte Homogenate der einzelnen Gruppen, also MOG induzierte Tiere insgesamt, gegen CFA Kontrollen insgesamt, gegeneinander auf der Membran verglichen.

Die Nitrozellulose Membranen wurden dann entwickelt und fotografiert, danach die Ergebnisse mit einem Scanner digitalisiert und mit Adobe-Photoshop so bearbeitet, dass die Markerbanden durch die entsprechende Zahl des Molekulargewichts ersetzt wurde.

#### **3.2.1 Nachweis von phosphoryliertem Tau bei der MOG induzierten EAE bei LEW.1N Ratten**

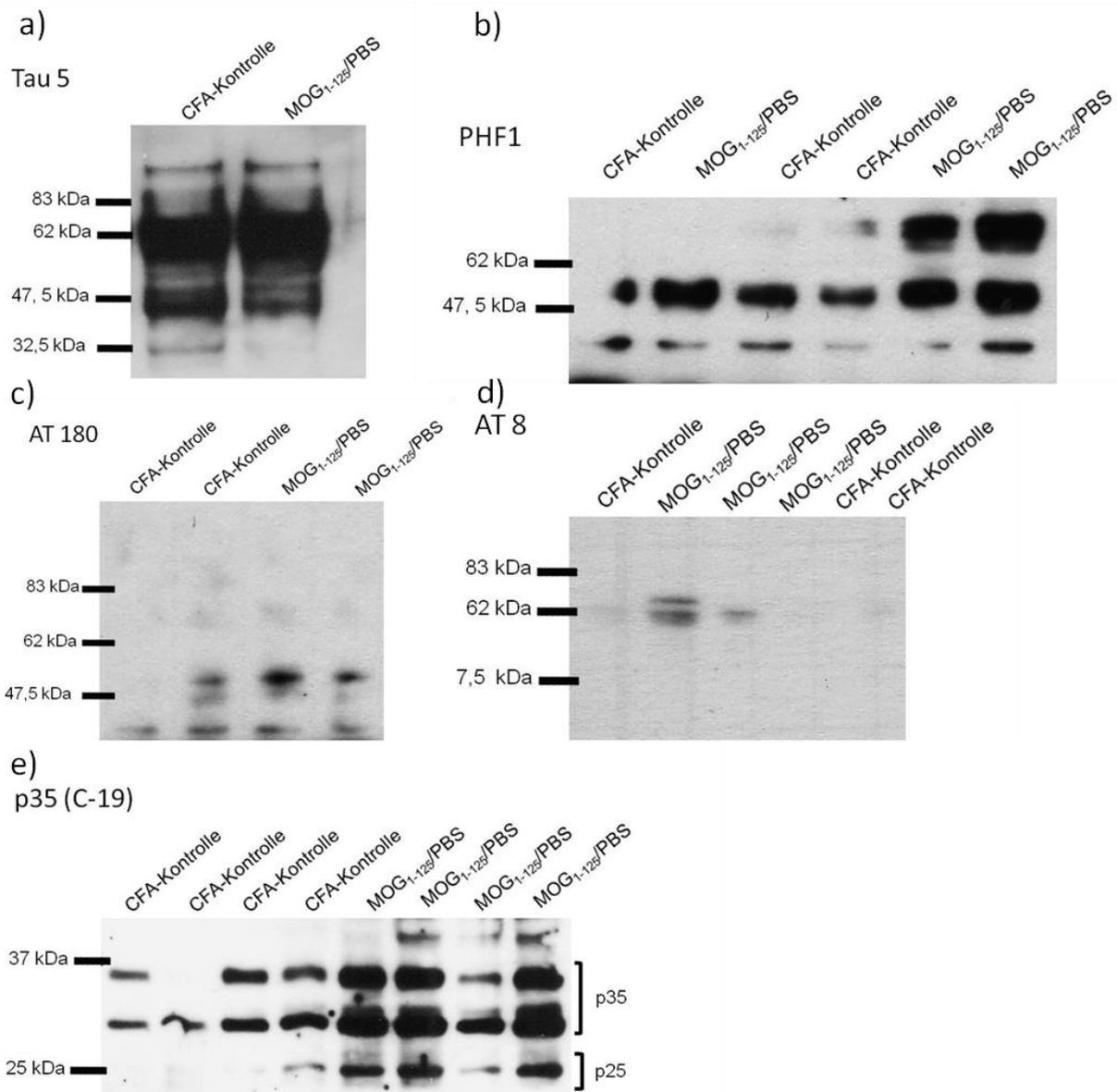
Bei den durchgeführten Westernblots konnte bei den LEW.1N Ratten bei dem Blot mit Tau5 Antikörper (Nachweis von Gesamt Tau) kein Unterschied zwischen der MOG immunisierten und der CFA Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 10a). Bei der Dekoration der beiden Gruppen mit spezifischen Antikörpern gegen hyperphosphoryliertes Tau (PHF Tau), zeigte sich bei verschiede-

nen Antikörpern ein unterschiedliches und zum Teil auch variables Bild. Während die Dekoration mit PHF1 Antikörper sowohl in der Gruppe der MOG immunisierten, als auch in der Gruppe der CFA Kontrollen pathologisch verändertes Tau detektieren konnte (Abb. 10b), zeigten die Antikörper AT8 und AT180 einen stärkeren Nachweis von PHF Tau in der MOG immunisierten Gruppe, als bei den CFA Kontrollen (Abb. 10c-d). Ein eindeutiger Unterschied konnte aber auch hier nicht sicher gezeigt werden.

Der Nachweis des p35 Spaltprodukts p25 gelang mit dem spezifischen Antikörper p35 (C-19). Hier zeigte sich bei den MOG immunisierten Tieren die p25 Bande bei 25kDa deutlich ausgeprägter als bei den Kontrolltieren (Abb. 10e).

### **3.2.2 Nachweis von phosphoryliertem Tau bei der MOG induzierten EAE bei LEW.1AV1 Ratten**

Wie schon oben beschrieben wurde auch bei den LEW.1AV1 Ratten mit Tau5 das Gesamt Tau nachgewiesen, welches keinen Unterschied zwischen den Gruppen zeigte (Abb. 11a). Die Detektion von hyperphosphoryliertem Tau zeigte auch bei den LEW.1AV1 Tieren Unterschiede zwischen PHF1 und AT8 bzw. AT180. Während mit PHF1 kein Unterschied zwischen der MOG immunisierten und der Kontrollgruppe gezeigt werden konnte (Abb.11 b), wurde AT180 nur in der MOG Gruppe nachgewiesen (Abb.11. c-d). Eine Spaltung von p35 zum Spaltprodukt p25 wurde in beiden Gruppen detektiert, wobei der Nachweis bei der MOG immunisierten Gruppe deutlicher erschien (Abb. 11e).

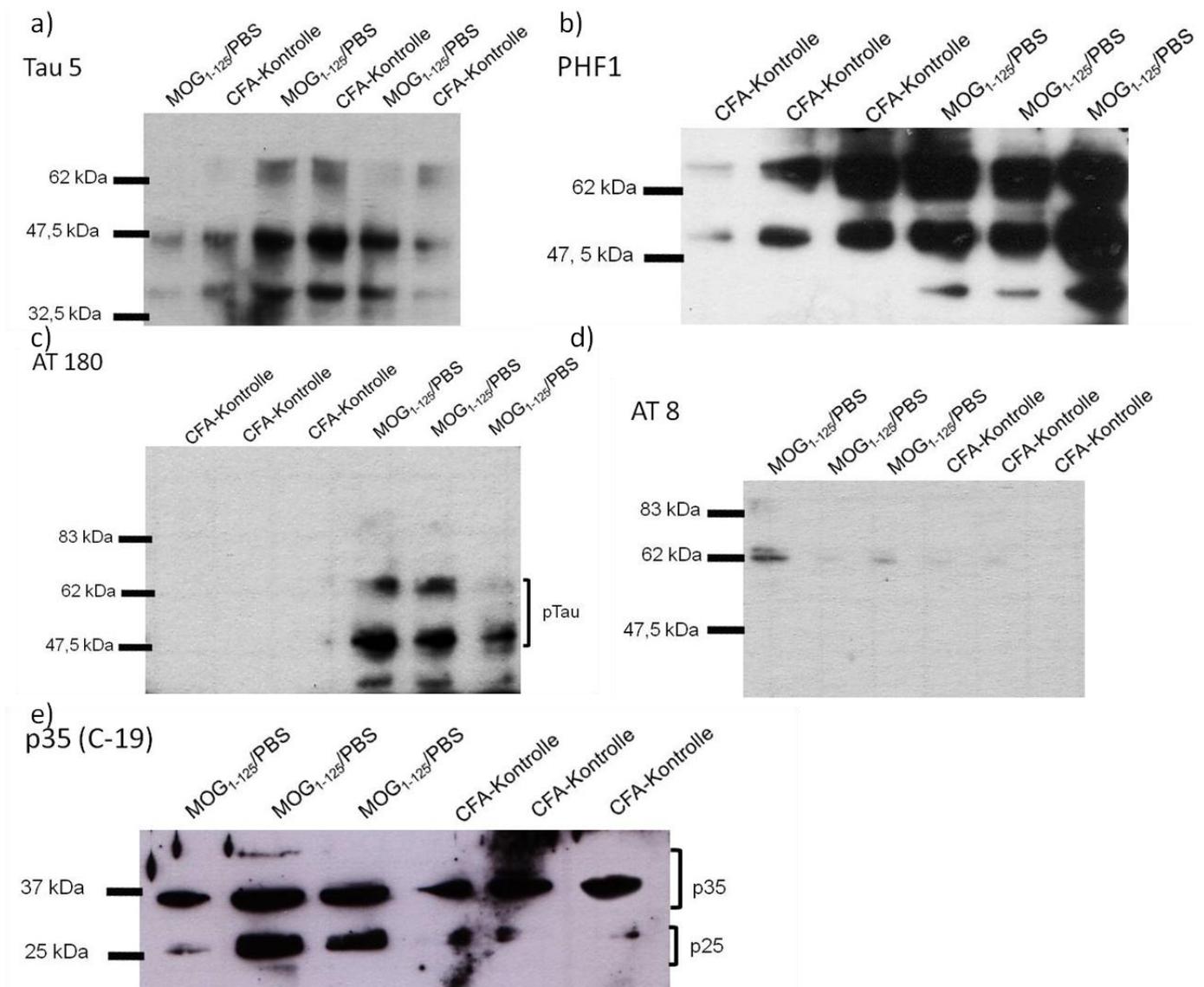


**Abb. 10: Western Blots bei LEW.1N Ratten zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau Protein**

Grafik a) zeigt das Ergebnis des Western Blots mit Tau 5, einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes und unphosphoryliertes Tau (Gesamt-Tau). Die Banden der beiden Gruppen zeigen keinen Unterschied. Tau findet sich zwischen 45 und 62,5kDa

Grafik b), c) und d) zeigen die Ergebnisse der Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen hyperphosphoryliertes Tau. Die Banden der MOG induzierten Tiere erscheinen deutlicher ausgeprägt, v.a. bei den Blots mit AT8 und AT 180.

Grafik e) zeigt den Nachweis von p35/p25 mit dem spezifischen Antikörper p35 (C-19) bei der MOG induzierten EAE in LEW.1N Ratten. Bei den MOG-induzierten (Spur 4-8) Tieren kommt es zu einem Nachweis des p35-Spaltprodukts p25.



**Abb. 11: Western Blot bei LEW.1AV1 Ratten zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau Protein**

Grafik a) zeigt das Ergebnis des Western Blots mit Tau 5, einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes und unphosphoryliertes Tau (Gesamt Tau). Die Banden der beiden Gruppen zeigen keinen Unterschied. Tau findet sich zwischen 45 und 62,5kDa

Grafik b), c) und d) zeigen die Ergebnisse der Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen hyperphosphoryliertes Tau. Bei PHF1 als spezifischen Antikörper lässt sich kein Unterschied zeigen. Bei beiden Gruppen wurde hyperphosphoryliertes Tau nachgewiesen. Bei den Blots mit den spezifischen Antikörpern AT8 und AT180 zeigt sich bei den MOG immunisierten Tieren ein Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau, wohingegen bei den Kontrollen kein hyperphosphoryliertes Tau detektiert werden konnte. Grafik e) zeigt den Nachweis von p35/p25 mit dem spezifischen Antikörper p35 (C-19) bei der MOG induzierten EAE bei LEW.1AV1 Ratten. In Spur 1-3 (MOG immunisierte Tiere) zeigt sich eine Bande bei 25 kDa als Nachweis des p35 Spaltprodukts p25.

### **3.3. Behandlung bei der MOG induzierten EAE bei LEW.1N Ratten mit einem kommerziellen CDK5 Inhibitor (R-Roscovitine) durch intraperitoneale (i.p.) Applikation**

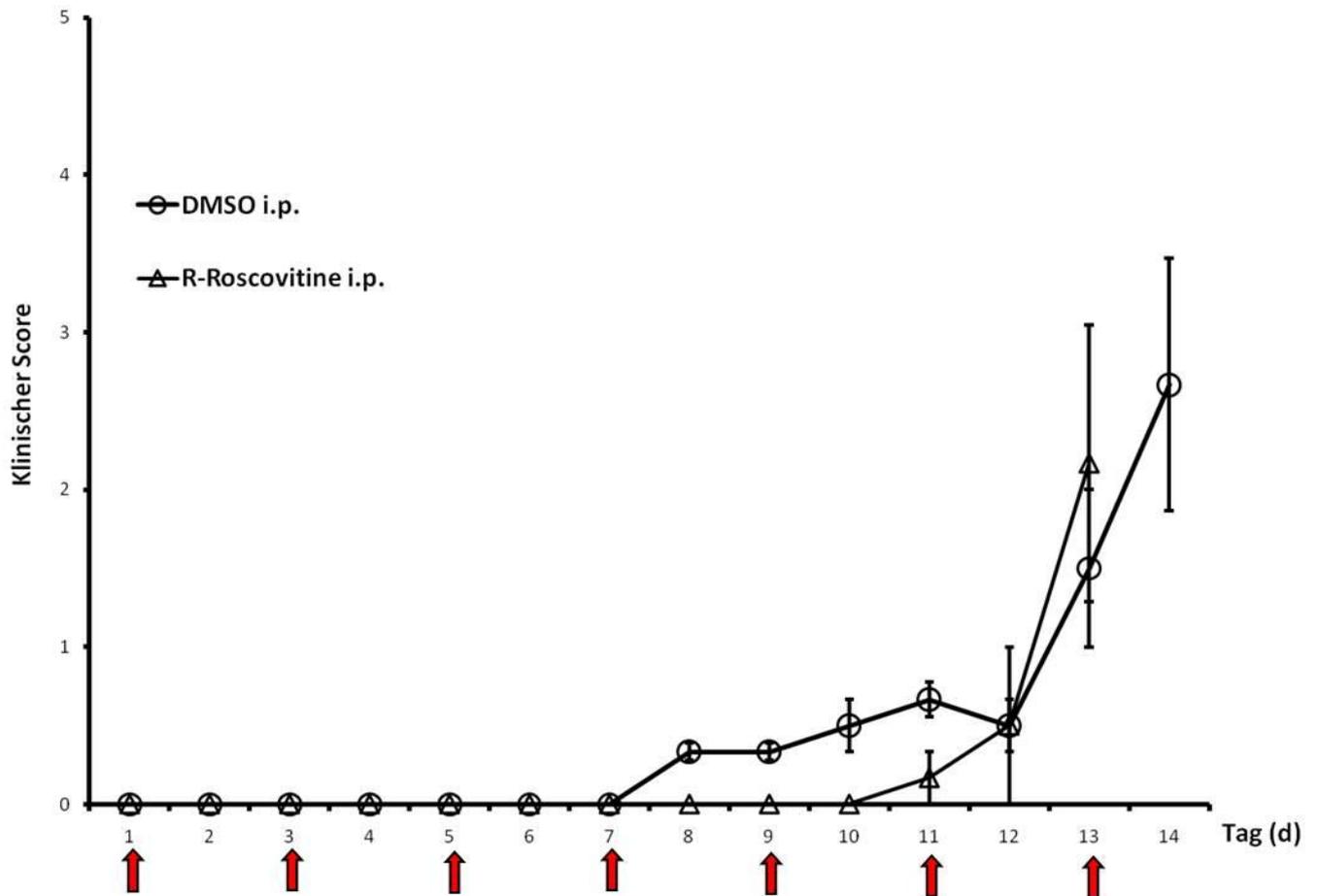
Zur Evaluierung, ob eine in vivo CDK5 Inhibition einen Effekt auf die Ausprägung und Schwere einer MOG induzierten EAE bei verschiedenen Rattenstämmen (LEW.1N, LEW.1AV1), sowie die Hyperphosphorylierung von Tau Protein im Gehirn betroffener Tiere hat, wurde nach vorherigem Schema bei LEW.1N und LEW.1AV1 Ratten einen EAE induziert und dann, wie in Material und Methoden unter 2.1.4 beschrieben, der kommerzieller CDK5 Inhibitor R-Roscovitine in einer Dosierung von 10 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Es wurde dabei eine Roscovitine Applikation alle 48 Stunden ab dem 1. Tag nach Immunisierung bis zum Experimentende als prophylaktischen Behandlungsansatz evaluiert. Als weiteres therapeutisches Behandlungsregime wurde die i.p. Applikation bei Eintritt der Symptome am 10. Tag nach Immunisierung und einer 2. Applikation am 14. Tag nach Immunisierung untersucht. Die Ratten wurden fortlaufend nach obigem Schema klinisch beurteilt und gewogen. Als Auswertung wurden die Mittelwerte des klinischen Scores in ein Diagramm aufgetragen und statistisch die AUC der Gruppen miteinander verglichen.

Zur weiteren Untersuchung der Gehirne auf hyperphosphoryliertes Tau, CDK5 und p35/p25 Spaltung wurden, wie oben beschrieben, Western Blots der entsprechenden Gruppen ergänzt.

#### **3.3.1 Behandlung der LEW.1N Ratten durch intraperitoneale Applikation von R-Roscovitine in einem prophylaktischen Behandlungsregime**

Wie in Tab. 3 zu sehen zeigte sich im prophylaktischen Ansatz, wie in den ersten Versuchen ohne Behandlung mit R-Roscovitine, der gewohnt heftige Krankheitsverlauf bei den LEW.1N stämmigen Tieren. Dabei zeigte sich kein statistischer Unterschied ( $p = 0,6 > 0,05$ ) zwischen Tieren, die alle 48h R-Roscovitine erhalten hatten, und solchen, die in der Kontrollgruppe eine i.p. Applikation von DMSO erhielten. Lediglich der Krankheitsbeginn war minimal nach

hinten verschoben. Alle Tiere beider Gruppen erkrankten und hatten bereits am Tag 13 nach Immunisierung schwere neurologische Beeinträchtigungen.



**Abb.12: Krankheitsverlauf nach prophylaktischer i.p. Applikation von R-Roscovitine bei LEW.1N**

Auf der X-Achse sind die Tage nach Immunisierung aufgetragen, auf der Y-Achse die Schwere des Krankheitsscores (+/- SEM). Die Immunisierung mit MOG<sub>1-125</sub> wurde am Tag 0 durchgeführt. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der i.p. Applikation des Medikaments, bzw. der Kontrolle. Die prophylaktische Gabe von R-Roscovitine i.p. (Dreiecke) erfolgte alle 48h ab Tag 1 nach Immunisierung bis Versuchsende (n=3), die Kontrollgruppe (Kreise) (n=3) wurde alle 48 h mit DMSO behandelt. Es zeigt sich kein statistischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p > 0,05$ )

Stamm	Immuni- sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Score MEAN	Standard- abweichung (+/- SD)	Tag des Krankheits- eintritts (+/-) SD
LEW. 1N	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	R-Roscovotine 10mg/kg i.p alle 48h ab Tag 1	3	3/3	2,17	+/- 1,53	11 (+/- 1)
LEW. 1N	100µl PBS + 100 µl CFA	490µl 0,9%NaCl +10µl DMSO	3	3/3	2,67	+/- 1,15	9,5 (+/- 2,89)

**Tab. 3: Deskriptive Statistik bei prophylaktischer i.p. Roscovitine Behandlung von LEW.1N Ratten**

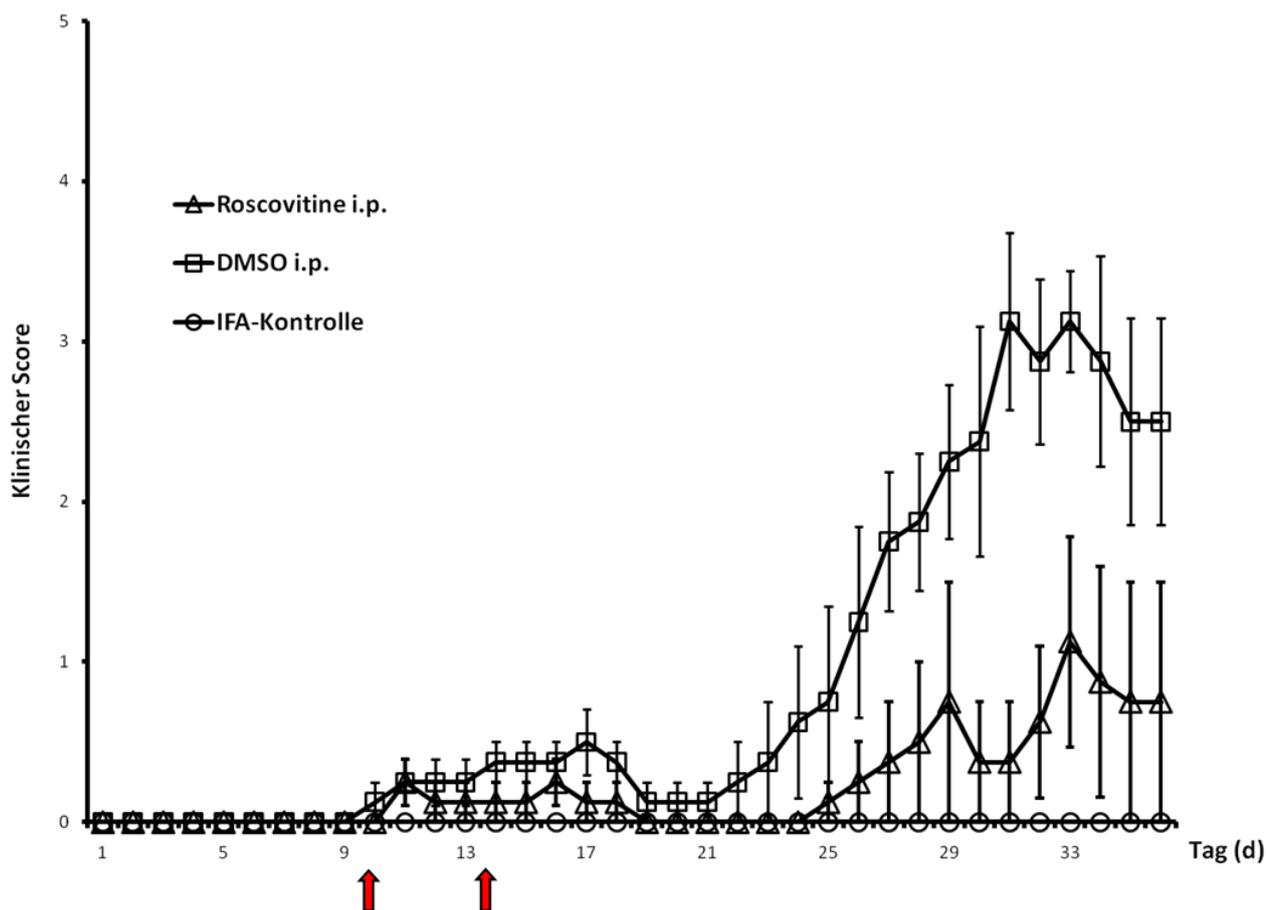
### 3.3.2. Behandlung der LEW.1N Ratten durch intraperitoneale Applikation von R-Roscovitine in einem therapeutischen Behandlungsregime

Im therapeutischen Regime wurde den LEW.1N Ratten R-Roscovitine 10 mg/kg KG i.p. am 10. und 14. Tag nach Immunisierung appliziert. Es wurden 2 Kontrollgruppen gebildet; die eine Gruppe wurde mit DMSO statt Roscovitine i.p. behandelt (Kontrolle der Wirkung), der anderen Kontrollgruppe wurde das Medikament verabreicht, ohne vorher eine EAE mit MOG zu induzieren (IFA Immunisierung / Kontrolle der Nebenwirkungen).

Als weiterer Unterschied zum Vorexperiment wurde in diesem Versuch die Immunisierung der Tiere nicht mit CFA, sondern mit IFA durchgeführt, um auch bei den LEW.1N Tieren einen weniger heftigen und schnell progredienten Verlauf der EAE zu erreichen.

In Abb. 13 ist der Verlauf der Erkrankungen aufgetragen. Es zeigt sich, dass durch die Immunisierung mit IFA statt CFA eine deutliche Abmilderung des Krankheitsverlaufes, sowie ein deutlich verzögerter Beginn der Symptomatik zu beobachten war. Eine deutliche Zunahme der Symptome konnte in den Roscovitine und DMSO behandelten Gruppen erst nach dem 20. Tag beobachtet werden. Weiterhin zeigten sich bei der nicht induzierten Gruppe keine Krankheitssymptome oder Therapienebenwirkungen. Der Vergleich aller Gruppen zeigte einen signifikanten Unterschied der Gruppen ( $p = 0,03$ ). Der Unterschied

zwischen der Behandlungsgruppe R-Roscovitine und der DMSO behandelten Gruppe war grenzwertig signifikant ( $p = 0,047$ ). Auch zwischen Kontrollgruppe DMSO und IFA Kontrolle zeigte sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied ( $p = 0,046$ ). Zwischen der nicht immunisierten Kontrolle und der R-Roscovitine behandelten Gruppe war kein signifikanter Unterschied zu beobachten ( $p = 0,4$ ).



**Abb. 13: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.p. Applikation von R-Roscovitine bei LEW.1N**

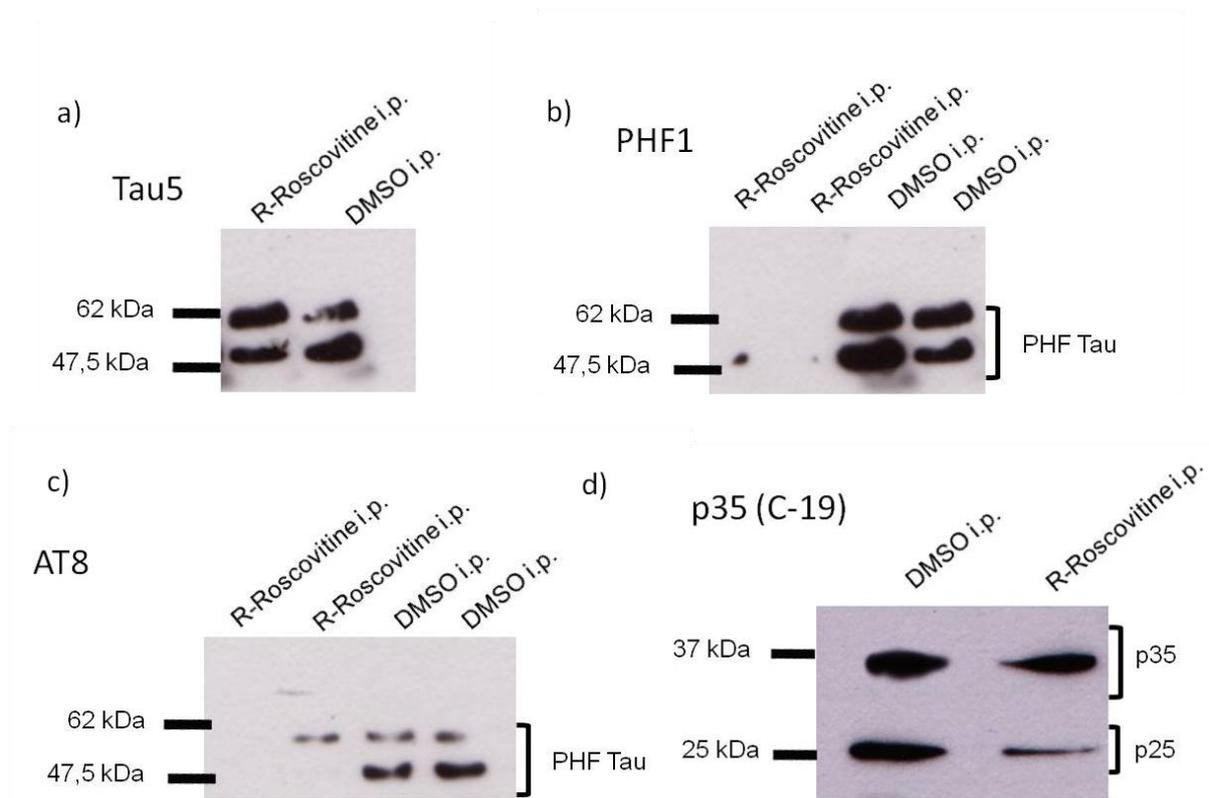
Auf der X-Achse sind die Tage nach MOG-Immunisierung aufgetragen, die Y-Achse zeigt den klinischen Krankheitsscore. Die Kurven zeigen den Krankheitsverlauf der Tiere an den einzelnen Tagen (+/- SEM). Die Behandlungsgruppe wurde an Tag 10 und 14 (rote Pfeile) mit R-Roscovitine i.p. (Dreiecke) ( $n = 4$ ), die Behandlungskontrolle mit DMSO i.p. (Vierecke) ( $n=4$ ) behandelt. Eine weitere Kontrolle wurde nicht MOG immunisiert, sondern mit IFA alleine und wie oben mit R-Roscovitine i.p. behandelt (Kreise) ( $n=2$ ). Der Unterschied der Gruppen wurde über die AUC ermittelt ( $p = 0,03$ ).

Stamm	Immuni- sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Score MEAN	Standard- abweichung (+/- SD)	Tag des Krankheits- eintritts (+/- SD)
LEW. 1N	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl IFA	R- Roscovitine 10mg / kgKG R- Rosco/10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	4	2/4	1,25	+/- 1,19	20,75 (+/- 8,37)
LEW. 1N	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl IFA	10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	4	4/4	3,25	+/- 0,65	10,25 (+/- 0,96)
LEW.1N	100 µl PBS + 100 µl IFA	R- Roscovitine 10mg / kgKG R- Rosco/10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	2	0/2	0	0	-----

**Tab.4: Deskriptive Statistik bei therapeutischer i.p. Roscovitine Behandlung von LEW.1N Ratten**

### 3.3.3 Nachweis von phosphoryliertem Tau nach der i.p. Behandlung mit R-Roscovitine bei LEW.1N

Zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau wurden die Tiere wie in Material und Methoden beschrieben zum Western Blot vorbereitet und erneut die spezifischen Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau, sowie gegen das p35 Spaltprodukt p25 zur Immunodetektion verwendet. Die Gesamtmenge an normalem Tau war bei beiden Behandlungsgruppen gleich (Abb. 14a). Mit den spezifischen Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau PHF1 und AT8 ließ sich eine stärkere Hyperphosphorylierung von Tau Protein bei der mit DMSO i.p. behandelten gegenüber der R-Roscovitine behandelten Gruppe zeigen (Abb. 14b-c). Weiterhin konnte auch eine vermehrte Spaltung von p35 zu p25 bei der DMSO behandelten Gruppe gezeigt werden.



**Abb. 14: Western Blot bei LEW.1N nach der MOG Immunisierung und therapeutischer intraperitonealer R-Roscovitine Applikation**

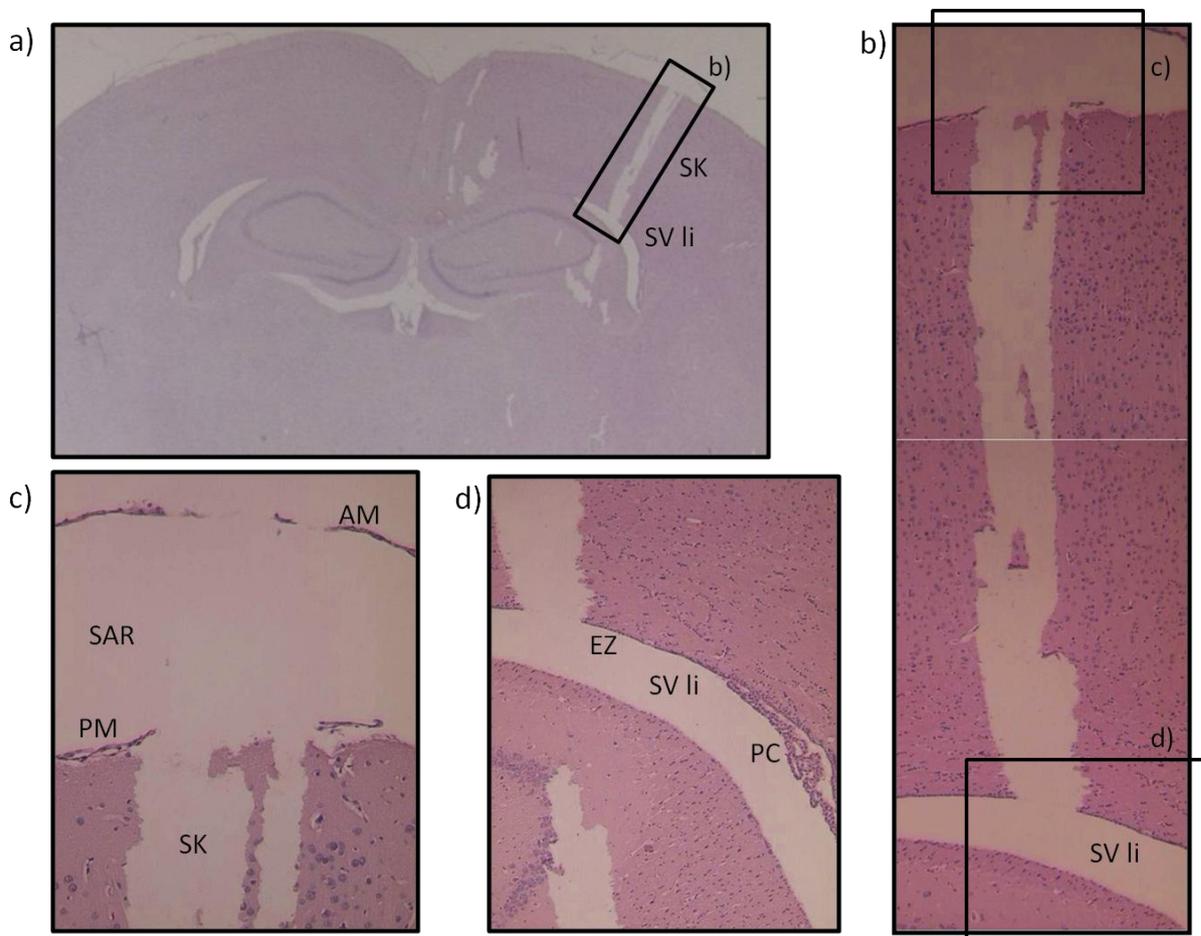
Grafik a) zeigt das Ergebnis des Western Blots mit Tau 5, einem spezifischen Antikörper gegen Gesamt Tau. Die Banden der beiden Gruppen zeigen keinen Unterschied. Tau findet sich zwischen 45 und 62,5kDa

Grafik b) und c) zeigen die Ergebnisse der Western Blots mit den spezifischen Antikörpern gegen hyperphosphoryliertes Tau. Bei PHF1 als spezifischen Antikörper ließ sich hyperphosphoryliertes Tau nur in der DMSO behandelten Gruppen nachweisen. In der R-Roscovitine behandelten Gruppe ließ sich kein hyperphosphoryliertes Tau detektieren. Mit dem Antikörper AT8 ließ sich auch in der DMSO behandelten Gruppe mehr hyperphosphoryliertes Tau detektieren, als in der R-Roscovitine behandelten Gruppe.

Grafik d) zeigt den Nachweis von p35/p25 mit dem spezifischen Antikörper p35 (C-19). Hierbei zeigt sich ein vermehrtes p25 bei der DMSO behandelten Gruppe im Vergleich zur R-Roscovitine behandelten Gruppe.

### 3.4. Behandlung MOG induzierter LEW.1N Ratten durch intrathekale (i.t.) Applikation von R-Roscovitine in einem therapeutischen Regime

Bei den MOG immunisierten LEW.1N. Ratten wurde zusätzlich zum prophylaktischen und therapeutischen i.p. Behandlungsregime versucht durch eine intrathekale (i.t.) Applikation eine direktere Einwirkung des CDK5 Inhibitors auf das ZNS zu erzielen. Hierfür wurde den nach obigem Schema immunisierten Tieren über eine stereotaktische Operation 200µg R-Roscovitine in 25 µl artifiziellem Liquor (aCSF) in den linken Seitenventrikel appliziert. Die Kontrolltiere wurden derselben operativen Prozedur unterzogen und erhielten statt R-Roscovitine 25µl aCSF mit DMSO.

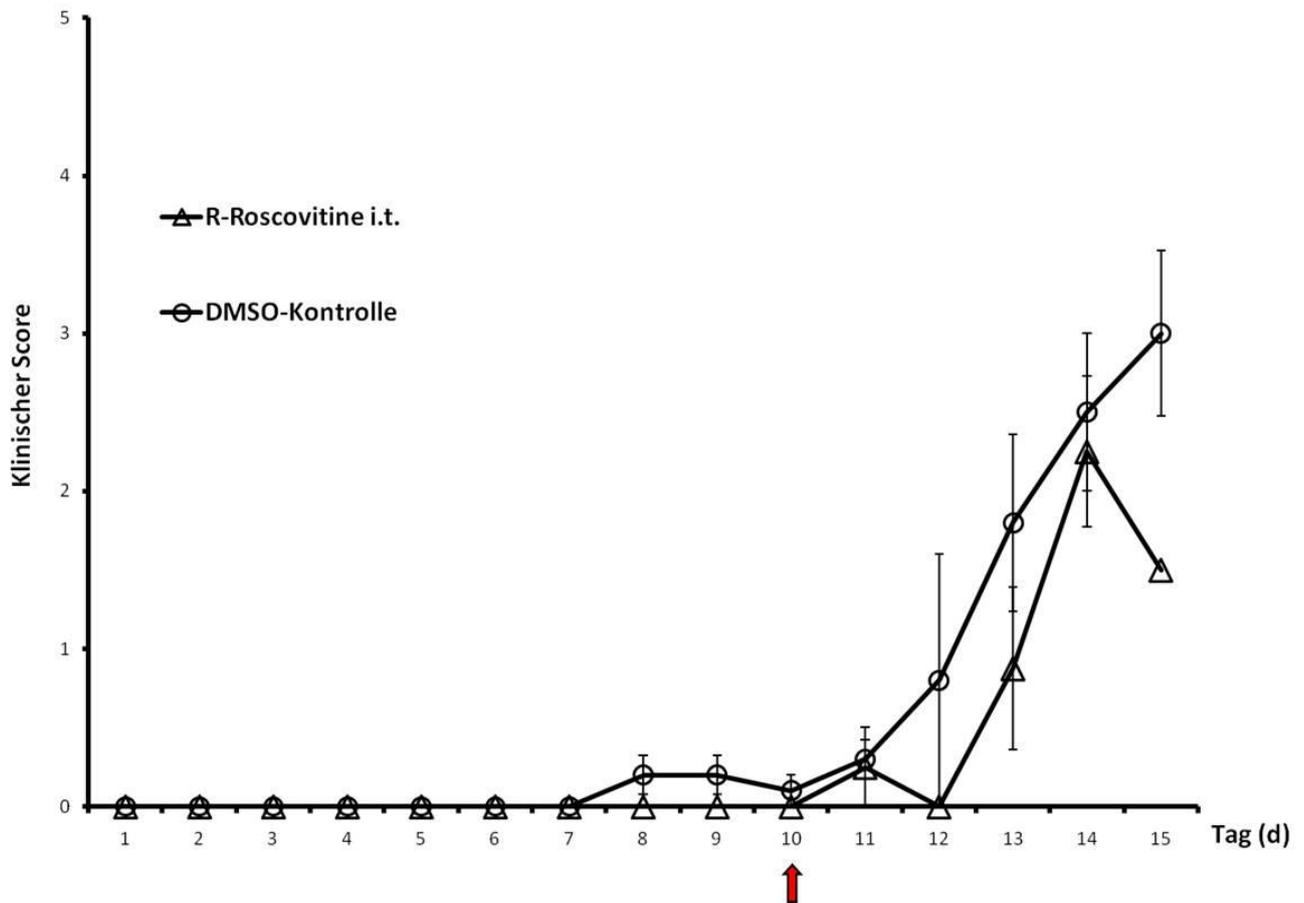


**Abb. 15: H.E. Färbung nach i.t. Injektion zur Darstellung des Stichkanals**

a) H.E. Färbung, coronar, 1,2 fache Vergrößerung, Ausschnittvergrößerung in b)  
 b) H.E., coronar, 5 fache Vergrößerung, Stichkanal mit Piaeintritt und Ependymeintritt, Ausschnittvergrößerung c) und d);  
 c) H.E., coronar, 10fach, Arachnoidal und Pia durchtritt;  
 d) H.E., coronar, 10fach, Ependymdurchtritt, linker Seitenventrikel mit Plexus choroideus;  
 SK = Stichkanal, SV = Seitenventrikel, SAR = Subarachnoidalraum, AM = Arachnoidea mater, PM = Pia mater, PC = Plexus choroideus, EZ = Ependymzellen

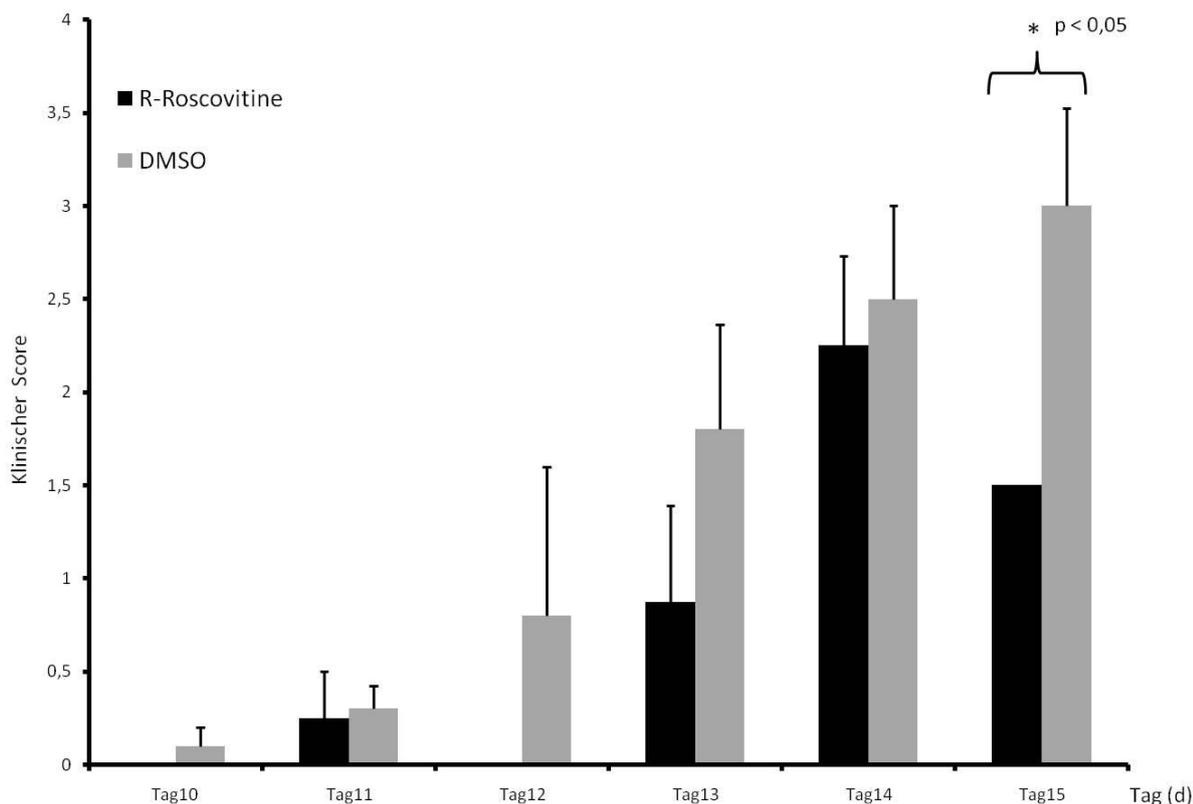
Abb. 15 zeigt einen Coronarschnitt durch das Gehirn einer i.t. behandelten LEW.1N Ratte in einer H.E. Standardfärbung mit Nachweis des Stichkanals zum linken Seitenventrikel. Abb 15 a) zeigt einen Überblick in Lupenvergrößerung mit deutlichem Stichkanal zum Seitenventrikel links. Abb. 15 b) zeigt eine Vergrößerung mit Darstellung des ganzen Stichkanals. Abb. 15 c) stellt den Durchtritt durch die Arachnoidea und Pia mater dar. Abb. 15 d) zeigt den Eintritt des Stichkanals in den linken Seitenventrikel mit Unterbrechung der Ependymzellschicht. Die vom Atlas übertragenen und zu dieser i.t. Injektion genutzten Koordinaten wurden durch diese histologische Aufarbeitung verifiziert und für die weiteren Experimente verwendet.

In Abb.16 zeigt sich der klinische Krankheitsverlauf der Tiere. Beide Gruppen zeigten nach der Operation kurzzeitig leichte Symptome mit weniger Bewegung und etwas Schwanzparese, erholten sich aber wieder bis zum Tag 11. Ein Tier aus der Behandlungsgruppe verstarb an perioperativen Komplikationen am Tag 11. Die Untersuchung zeigte eine linkshemispherische intrazerebrale Einblutung. Bei beiden Gruppen trat dann der gewohnt schwere Krankheitsverlauf bei MOG immunisierten LEW.1N Ratten auf. An Tag 14 zeigten beide Gruppen eine deutliche Ausprägung der EAE mit klinischen Scores von über 2 im Durchschnitt. Interessanterweise besserte sich bei allen R-Roscovitine behandelten Tieren die Symptomatik zum Versuchsende erneut, wohingegen die Schwere der Erkrankung bei der Kontrollgruppe weiter anstieg. Der Gesamtvergleich beider Gruppen ergab keinen statistischen Unterschied ( $p = 0,25$ ). Der Vergleich des durchschnittlichen Krankheitsscores an den einzelnen Tagen der Erkrankung ergab beim letzten Versuchstag einen statistischen Unterschied ( $p = 0,045$ ), zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe, wohingegen an allen anderen Tagen auch beim Vergleich der Scores keine statistische Signifikanz erreicht wurde (Abb. 17).



**Abb. 16: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.t. Applikation von R-Roscovitine bei LEW.1N**

Auf der X-Achse sind die Tage nach MOG Immunisierung aufgetragen, die Y-Achse zeigt den klinischen Krankheitsscore. Die Kurven zeigen den Krankheitsverlauf der Tiere an den einzelnen Tagen (+/- SEM). Die Behandlungsgruppe wurde an Tag 10 (roter Pfeile) mit R-Roscovitine i.t. (Dreiecke)(n = 5), die Behandlungskontrolle mit aCSF i.t. (Kreise) (n=5) behandelt. Die Krankheitsscores der Gruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,25$ ).



**Abb.17: Statistischer Vergleich des durchschnittlichen Krankheitsscores nach R-Roscovotine i.t. Applikation an einzelnen Tagen**

Im Säulendiagramm dargestellt sind die Mittelwerte des Krankheitsscores beider Gruppen (+ SEM) an Tag 10 – 15 nach Immunisierung. R- Roscovotine (schwarz) (n=4), DMSO (grau) (n=5). Der statistische Vergleich über einen Student’schen T-Test zeigte am Tag 15 einen statistischen Unterschied ( $p = 0,046$ ) der Gruppen

Stamm	Immuni- sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Score MEAN	Standard- abweichung (+/- SD)	Tag des Krankheits- eintritts (+/- SD)
LEW. 1N	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	200µg R- Roscovotine in 25µl aCSF i.t. Tag 10	5	4/5	2,38	+/- 1,81	12,4 (+/- 1,82)
LEW. 1N	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	200µl DMSO in 25µl aCSF i.t. Tag 10	5	5/5	3	+/- 2,35	10,2 (+/- 2,17)

**Tab.5: Deskriptive Statistik bei therapeutischer i.t. Roscovotine Behandlung von LEW.1N Ratten**

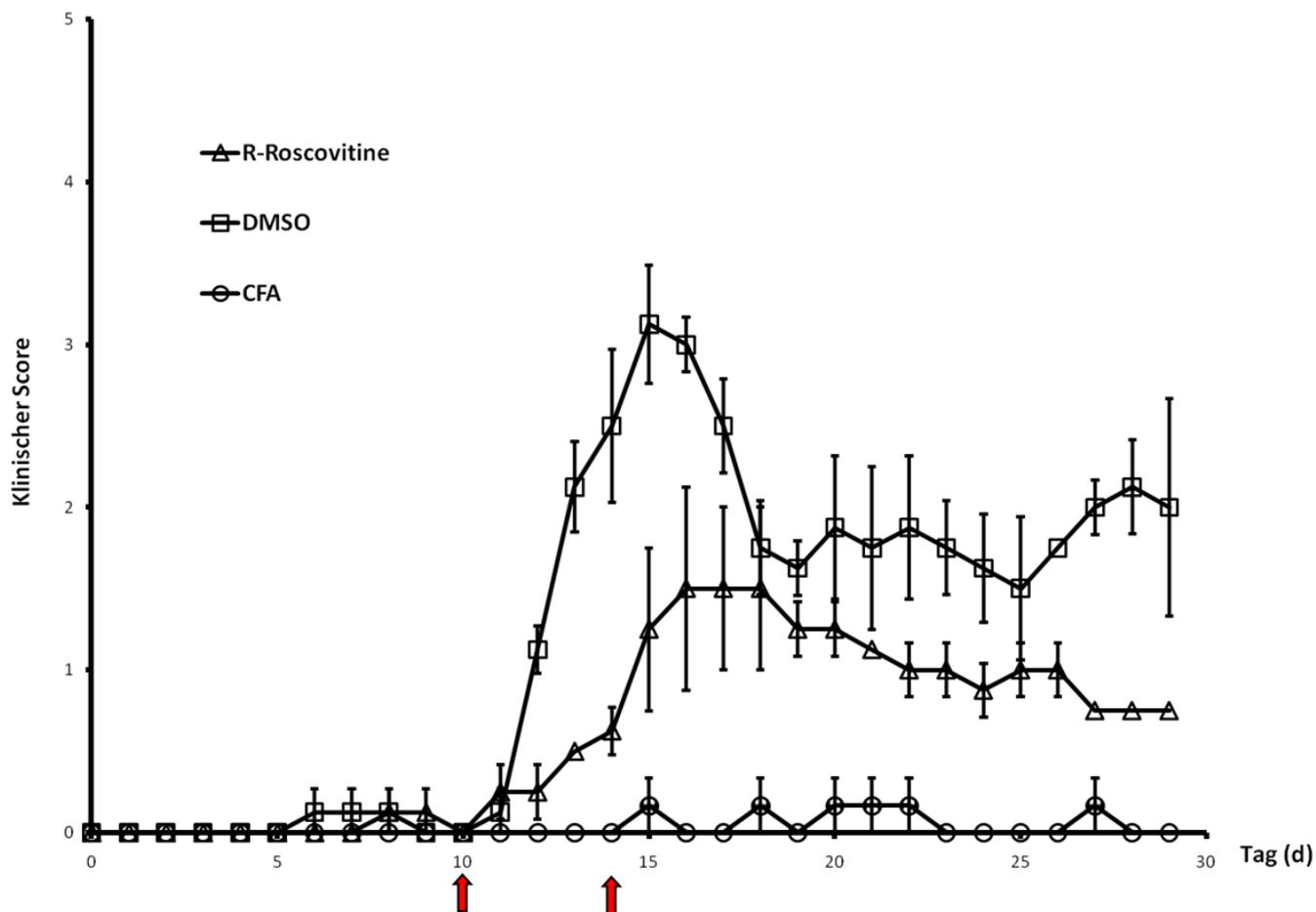
### **3.5. Behandlung von MOG induzierten LEW.1AV1 Ratten mit einem kommerziellen CDK5 Inhibitor (R-Roscovitine) durch intraperitoneale (i.p.) Applikation**

Zur Untersuchung, ob eine CDK5 Inhibition bei einem anderen Rattenstamm Wirkung auf die Ausprägung der EAE hat, wurden erneut LEW.1AV1 Ratten mit MOG<sub>1-125</sub> und CFA immunisiert. Danach wurde dasselbe Behandlungsregime, das bei LEW.1N Tieren eine Beeinflussung zeigte auf die LEW.1AV1 Tiere angewendet. Es erfolgte eine Applikation von 10mg/kg KG R-Roscovitine i.p. an Tag 10 und Tag 14 nach Immunisierung.

Wiederum wurde der klinische Score beurteilt und nach Versuchsende Gehirn und Rückenmark zur weiteren proteinbiochemischen Untersuchung genutzt. Zusätzlich hierzu wurde ein TNF- $\gamma$  ELISPOT aus den Milzen von je drei Versuchstieren pro Gruppe durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine mögliche Beeinflussung des Krankheitsverlaufes von einer Modulation der Immunantwort herrühren könnte.

#### **3.5.1 . Behandlung der LEW.1AV1 Ratten durch intraperitoneale Applikation von R-Roscovitine in einem therapeutischen Regime**

In Abb. 18 zeigt sich im Krankheitsverlauf graphisch ein Unterschied zwischen der CFA Kontrolle und der MOG immunisierten Gruppe, die mit R-Roscovitine behandelt wurde. Dieser Unterschied war aber nicht signifikant ( $p = 0,16$ ). Alle MOG induzierten Tiere erkrankten, egal zu welcher Behandlungsgruppe sie zählten. Zwischen der DMSO behandelten Gruppe und der CFA Kontrolle zeigt sich wie im Versuch ohne i.p. Behandlung ein signifikanter Unterschied im Erkrankungsverlauf der Tiere ( $p = 0,04$ ). Bei der mit R-Roscovitine behandelten Gruppe zeigt sich ein flacherer Anstieg der Krankheitsschwere und insgesamt ein weniger schweren Verlauf mit einem Maximum zwischen 2 und 3 ( $1,625 \pm 1,11$  SD), wohingegen die Kontrolle ein Maximum zwischen 2,5 und 4 aufwies ( $3,13 \pm 0,63$  SD). Ein signifikanter Unterschied zwischen der R-Roscovitine Behandlung und der DMSO-Kontrolle konnte nicht gezeigt werden ( $p = 0,24$ ).



**Abb.18: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.p. Applikation von R-Roscovitine bei LEW.1AV1**

Auf der X-Achse sind die Tage nach MOG Immunisierung aufgetragen, die Y-Achse zeigt den klinischen Krankheitsscore. Die Kurven zeigen den Krankheitsverlauf der Tiere an den einzelnen Tagen (+/- SEM). Die Behandlungsgruppe wurde an Tag 10 und 14 (rote Pfeile) mit R-Roscovitine i.p. (Dreiecke)(n = 4), die Behandlungskontrolle mit DMSO i.p. (Vierecke) (n=4) behandelt. Eine weitere Kontrolle wurde nicht MOG immunisiert, sondern mit CFA alleine und wie oben mit R-Roscovitine i.p. behandelt (Kreise) (n=3) Der Unterschied der Gruppen wurde über die AUC ermittelt ( $p = 0,08$ ).

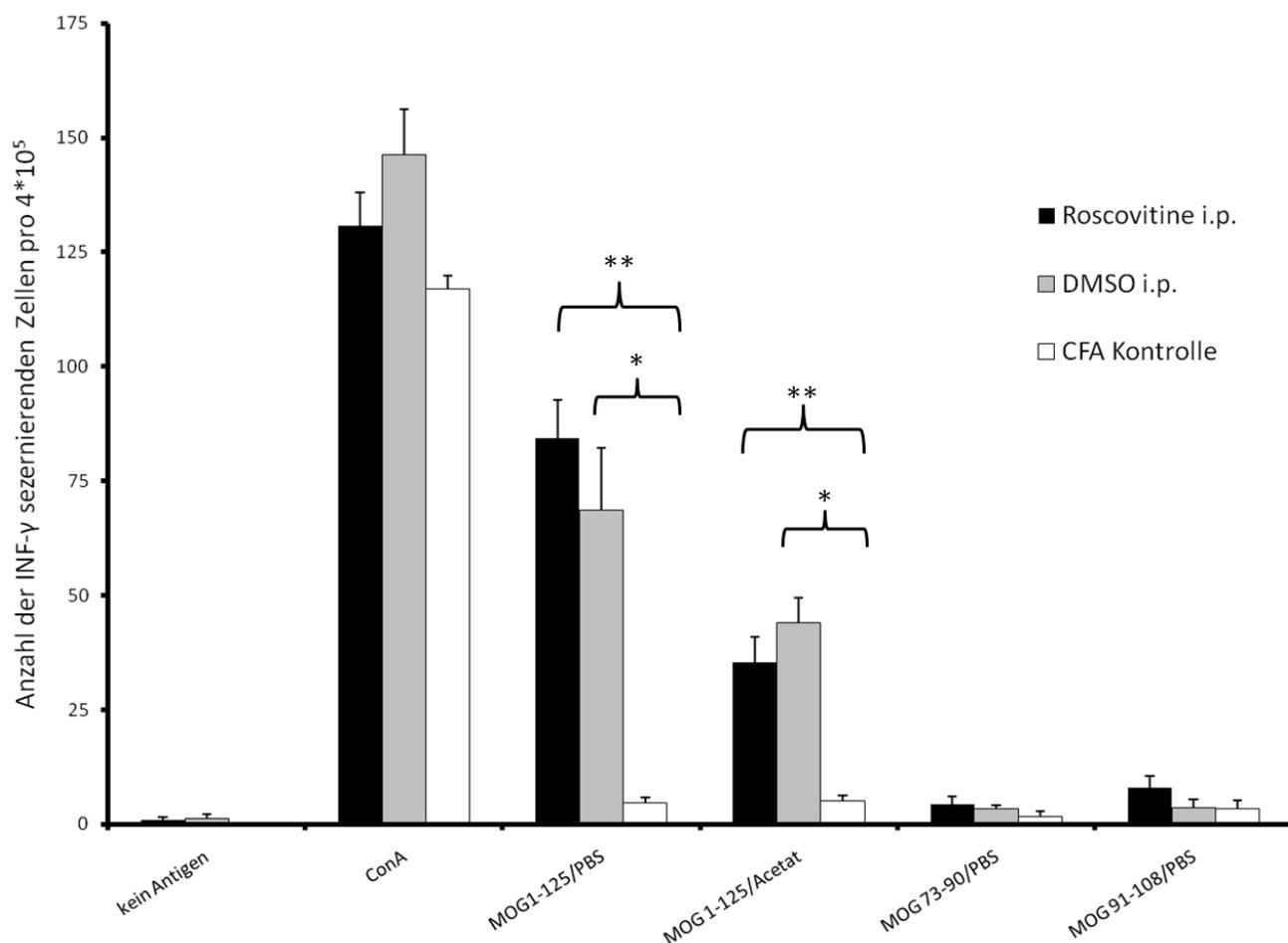
Stamm	Immuni- sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Sco- re MEAN	Standard- abwei- chung	Tag des Krankheits- eintritts
LEW. 1AV1	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	R- Roscovitine 10mg/kg i.p Tag 10 und 14	4	4/4	1,625	+/- 1,11	11,25 (+/- 1,15)
LEW. 1AV1	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	490µl 0,9%NaCl +10µl DMSO Tag 10 und 14	4	4/4	3,13	+/- 0,63	10,25 (+/- 2,87)
LEW. 1AV1	100µl PBS + 100 µl CFA	R- Roscovitine 10mg/kg i.p Tag 10 und 14	3	0/3	0,5	0	19,67 (+/- 1,53)

**Tab. 6: Deskriptive Statistik bei therapeutischer i.p. Roscovitine Behandlung von LEW.1AV1 Ratten**

### 3.5.2. ELISPOT der verschiedenen Behandlungsgruppen der MOG induzierten LEW.1AV Ratten

In Abb. 19 wurde die Anzahl der  $\gamma$ -Interferon produzierenden Zellen der Milz aus den einzelnen Gruppen verglichen. Hierzu wurden je 3 Tiere der verschiedenen Behandlungsmethoden, wie in Material und Methoden beschrieben, präpariert und die Milz zur Antigenstimulation vorbereitet. Die Auswertung der  $\gamma$ -Interferon produzierenden Zellen erfolgte nach Stimulation ohne Antigen (Negativkontrolle), mit ConA (Positivkontrolle), MOG<sub>1-125</sub>/PBS, MOG<sub>1-125</sub>/Acetat, MOG<sub>73-90</sub> und MOG<sub>91-108</sub>. Bei den Behandlungsgruppen konnte in einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) bei Stimulation ohne Antigen, mit ConA und mit den MOG-Peptiden MOG<sub>73-90</sub> und MOG<sub>91-108</sub> kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Lediglich bei der Stimulierung mit MOG-Peptid<sub>1-125</sub> konnte ein signifikanter Unterschied der Gruppen gezeigt werden ( $p = 0,002$ ). In einem T-Test zum Vergleich der Einzelgruppen, die zuvor als signifikant unterschiedlich getestet wurden, konnte gezeigt werden, dass es

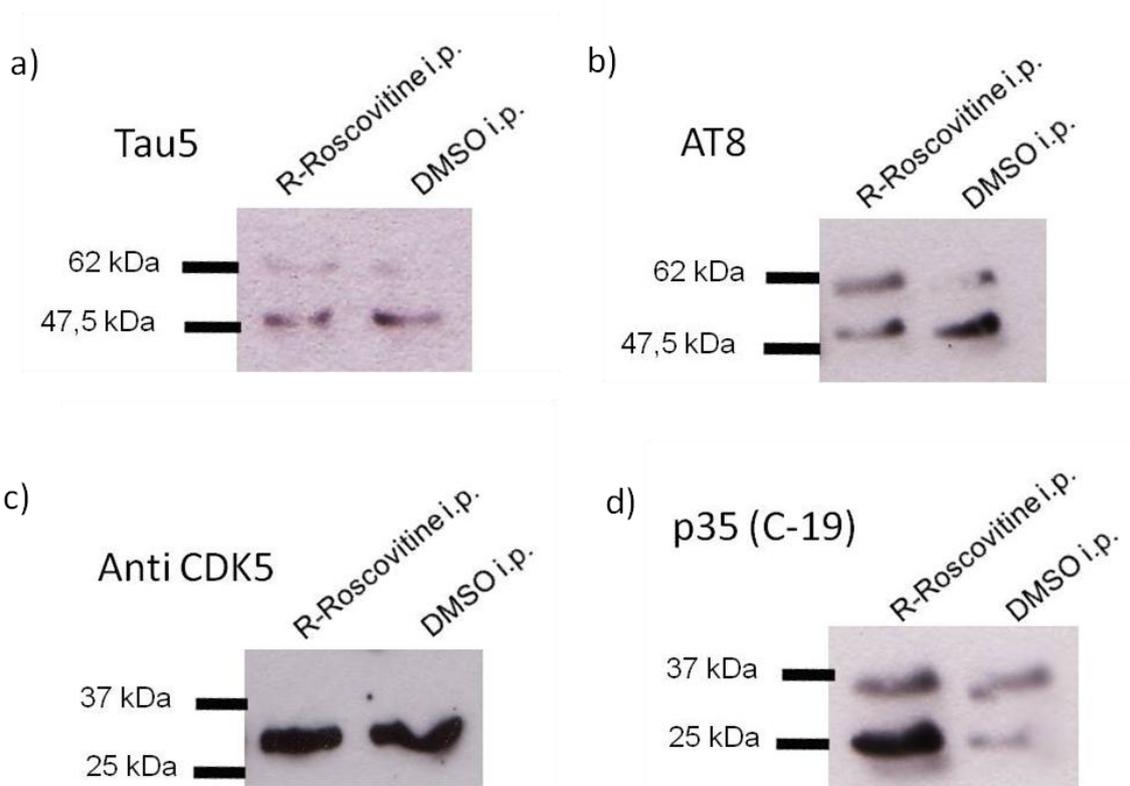
keinen Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen gab ( $p = 0,39$ , bzw.  $p = 0,33$ ). Die signifikanten Unterschiede bestanden zwischen den Behandlungsgruppen, egal ob mit DMSO oder mit R-Roscovitine behandelt, im Vergleich zur nicht MOG immunisierten Gruppe (\*  $p = 0,04$ ; \*\*  $p = 0,01$ ).



**Abb. 19: INF- $\gamma$  ELISPOT nach Stimulation von Milzzellen**

Stimulierung von Milzlymphozyten mit Hilfe von MOG Peptiden und Messung der Anzahl von INF- $\gamma$  sezernierenden Zellen. Auf der X-Achse sind die Antigene aufgetragen, mit denen die Milzlymphozyten stimuliert wurden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der detektierten INF- $\gamma$  Spots. Schwarz zeigt die mit Roscovitine i.p. ( $n = 3$ ), grau die mit DMSO i.p. behandelten ( $n = 3$ ) Gruppen. Weiß zeigt die Gruppe, die nicht MOG immunisiert wurde ( $n = 3$ ). In den einzelnen Gruppen zeigt sich kein Unterschied ( $p > 0,05$ ). Als Negativkontrolle wurde ohne Antigen restimuliert, als Positivkontrolle wurde ConA genutzt. Weitere Restimulierung mit MOG<sub>1-125</sub>/PBS oder MOG<sub>1-125</sub>/Acetat zeigten keinen Unterschied in den Behandlungsgruppen, aber einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und den nicht MOG induzierten Tieren (\*  $p = 0,04$ ; \*\*  $p = 0,01$ )

### 3.5.3 Nachweis von phosphoryliertem Tau nach der i.p. Behandlung mit R-Roscovitine bei LEW.1AV1



**Abb. 20: Western Blot bei LEW.1AV1 nach der MOG Immunisierung und therapeutischer intraperitonealer R-Roscovitine Applikation**

Grafik a) zeigt das Ergebnis des Western Blots mit Tau 5, einem spezifischen Antikörper gegen Gesamt Tau. Die Banden der beiden Gruppen zeigten sich nur schwach, aber ohne Unterschied zwischen den Gruppen. Die 2. Bande bei 60 kDa war sehr schwach ausgeprägt.

Grafik b) zeigt das Ergebnis des Western Blots mit dem spezifischen Antikörper AT8 gegen hyperphosphoryliertes Tau. Es ließ sich in beiden Behandlungsgruppen hyperphosphoryliertes Tau nachweisen.

Grafik c) zeigt den Nachweis von CDK5 in den beiden Behandlungsgruppen. Die Banden bei ca. 30-35 kDa detektieren CDK5 ohne Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.

Grafik d) zeigt die Detektion von p35/p25 mit dem spezifischen Antikörper p35 (C-19). Hierbei zeigt sich ein vermehrtes p25 bei der R-Roscovitine behandelten Gruppe im Vergleich zur DMSO behandelten Gruppe.

Zur weiteren Beurteilung wurde auch bei den LEW.1AV1 eine Immunodetektion von hyperphosphoryliertem Tau durchgeführt. Hierzu wurden die Gehirne der Tiere wie in Material und Methoden beschreiben zum Western Blot vorbereitet. Wie in Abb. 20 zu sehen, zeigte sich beim Nachweis von Gesamt Tau kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Auch im Nachweis des hyperphosphorylierten Tau konnte in diesem Versuch kein Unterschied detek-

tiert werden (Abb. 20b). Bei gleicher Menge CDK5 (Abb. 20c) konnte in der R-Roscovitine behandelten Gruppe ein vermehrte Spaltung von p35 nach p25 detektiert werden (Abb.20 d).

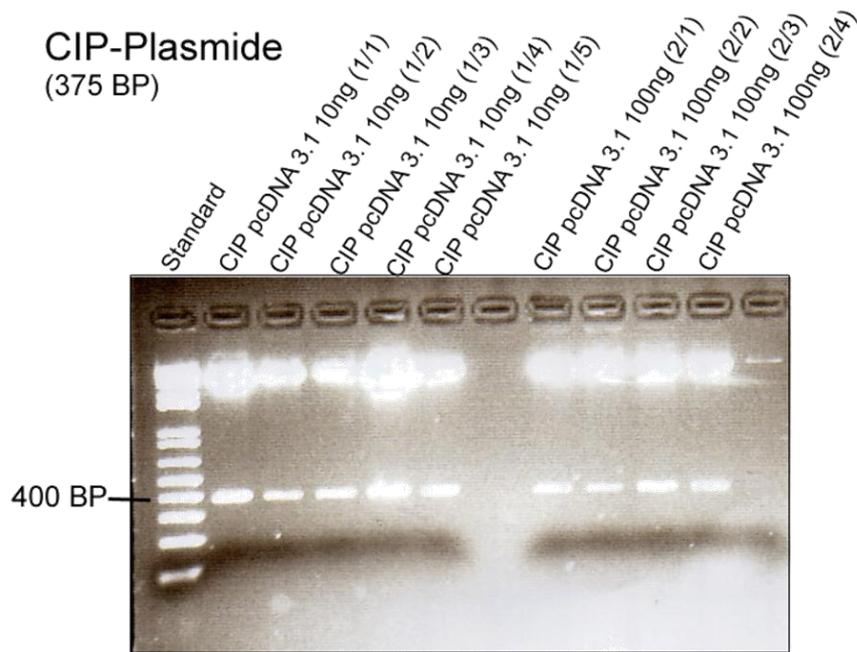
### **3.6. Klonierung, Sequenzierung, Induktion und Reinigung des CDK5 Inhibitor Proteins (CIP)**

Diese Versuche wurden durchgeführt, um das spezifische CDK5 Inhibitor Protein zu gewinnen, um in einer weiteren Versuchsreihe eine Behandlung von MOG induzierten Tieren mit dem p25/CDK5 spezifischen Inhibitor, statt mit dem kommerziellen Inhibitor R-Roscovitine durchführen zu können. Hierfür wurden uns freundlicherweise 2 unterschiedliche CIP codierende Plasmide zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um das CIP - pGEX-4T2 Plasmid, hergestellt von Niranja Amin, Ph.D (Dr. Harish C. Pant, Laboratory of Neurochemistry, National Institute of Neurological Disorders And Stroke, Bethesda, USA), sowie das CIP - pcDNA 3.1/ HIS C Plasmid, hergestellt von Yali Zheng, Ph.D (Dr. Harish C. Pant, Laboratory of Neurochemistry, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Bethesda, USA) . Die Plasmide wurden wie in Material und Methoden beschrieben extrahiert und in chemisch kompetente E. coli Bakterien transformiert und durch die auf den Plasmiden vorhandene Ampicillin Resistenz selektiert.

#### **3.6.1 Restriktionsverdau und Sequenzierung der CIP Plasmide**

Zur Sequenzkontrolle der in E.coli transformierten Plasmide wurde ein Verdau mir Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Beim CIP - pGEX-4T2 Plasmid wurde ein Verdau mit BamHI und EcoRI , beim CIP - pcDNA 3.1/ HIS C Plasmid mit EcoRI und XhoI durchgeführt und aufgereinigt. Da das CIP eine Aminosäuresequenz von 125 Aminosäuren besitzt wurde zur Kontrolle eine Agarose Gelelektrophorese mit 2% Agarose durchgeführt und eine Bande bei 375 Basenpaaren (base pairs (bp)) für beide Plasmide bei allen Anfangskonzentrationen und Proben nachgewiesen (Abb. 21-22).

Zum sicheren Nachweis wurden die Plasmide anschließend sequenziert. Die Amplifikation erfolgte mit den entsprechenden Sequenzierungsprimern (siehe 2.9). Die Sequenzierung zeigte in allen Proben die richtige CIP Nucleotidsequenz (Abb. 23). Daraufhin wurde das CIP - pGEX-4T2 Plasmid in elektrokompetente E. coli Bakterien transformiert und in Glycerolstocks zur weiteren Verwendung bei -80° C aufbewahrt.



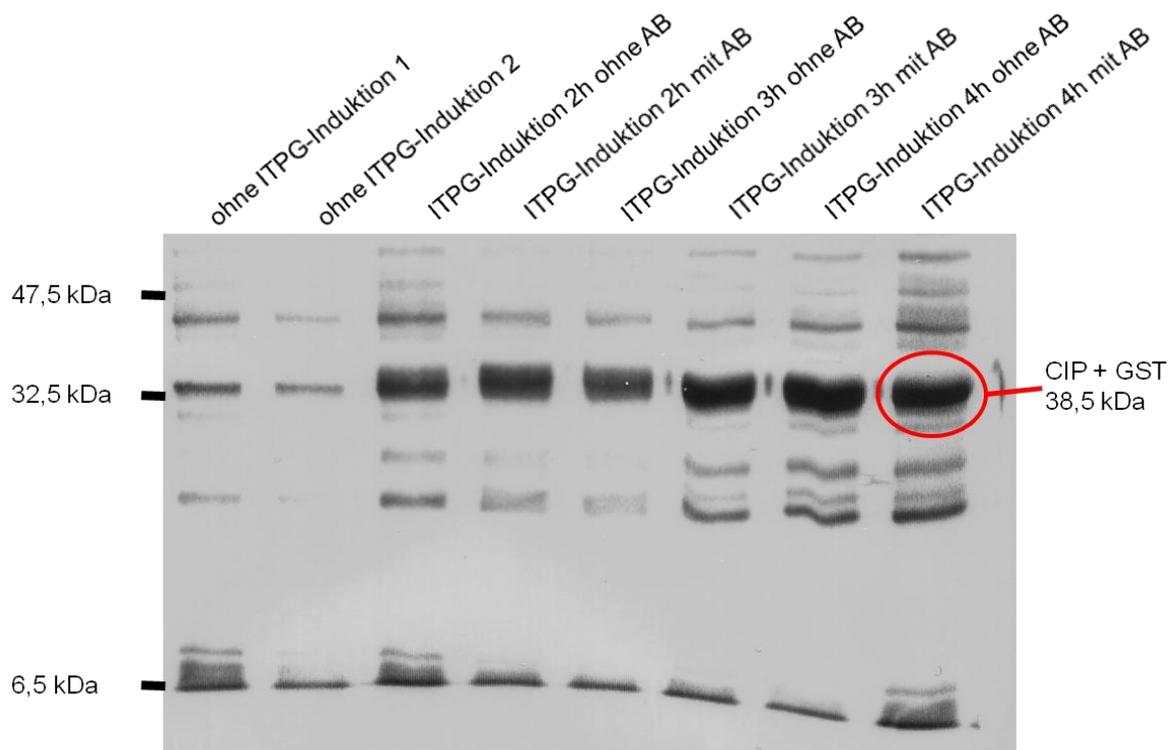
**Abb. 21: Agarose Gelelektrophorese (2% Agarose) von CIP - pcDNA 3.1/ HIS C**

Bei allen auf die Agarose aufgetragenen Proben des CIP - pcDNA 3.1/ HIS C Plasmids konnte sowohl bei einer initialen Menge von 10ng Plasmid DNA als auch bei einer Menge von 100 ng Plasmid DNA eine deutliche Bande bei ca. 375 bp nachgewiesen werden.



### 3.6.2 IPTG- Induktion des CDK5 Inhibitor Proteins

Die Expression von CIP ließ sich durch IPTG induzieren. Hierzu wurden wie in Material und Methoden beschriebenen Flüssigkulturen der Bakterien angelegt, mit Antibiotika selektiert und dann wie in 2.3.9 mit IPTG induziert. Zur Expressionskontrolle wurde eine SDS-page mit verschiedenen IPTG Konzentrationen, sowie einer negativ Kontrolle ohne IPTG durchgeführt. Die erwartete Bande aus CIP (12,5 kDa) und GST Fusionsprotein (26 kDa) zeigte sich bei ca. 38,5 kDa mit einem Optimum bei einer IPTG Einwirkung von 4 Stunden (Abb.24).

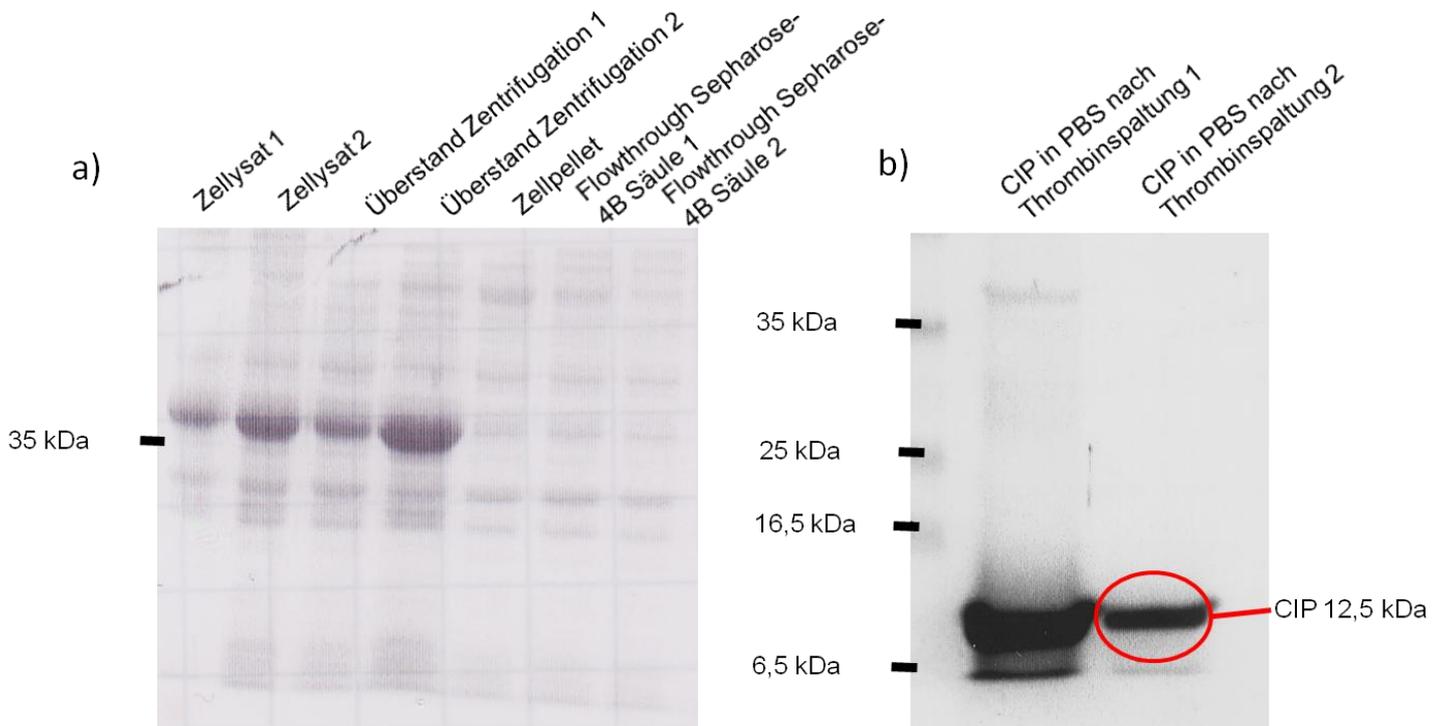


**Abb.24: Gelelektrophorese von CIP Induktion und Expression durch verschiedene Einwirkungszeit von IPTG bei CIP - pGEX-4T2 Plasmid transformierten E. coli Bakterien**

In der Abbildung ist eine sds-page nach unterschiedlicher IPTG Induktion von CIP pGEX-4T2 transformierten E. coli Bakterien zu sehen. Die beiden ersten Bahnen zeigen eine Negativkontrolle ohne Induktion. Bahn 3 und 4 nach 2 stündiger IPTG-Induktion, Bahn 5 und 6 nach 3 Stündiger IPTG-Induktion und Bahn 7 und 8 nach 4 stündiger IPTG-Induktion, jeweils mit und ohne Antibiotikum. Links sind die kDa Einheiten des mitgelaufenen Markers aufgetragen. Das Expressionsmaximum zeigt sich durch die Dicke der Bande bei ca. 38,5 kDa (CIP = 12,5 kDa + GST-Protein 26 kDa)

### 3.6.3. Säulenreinigung des CDK5 Inhibitor Proteins und Trennung vom GST Fusionsprotein

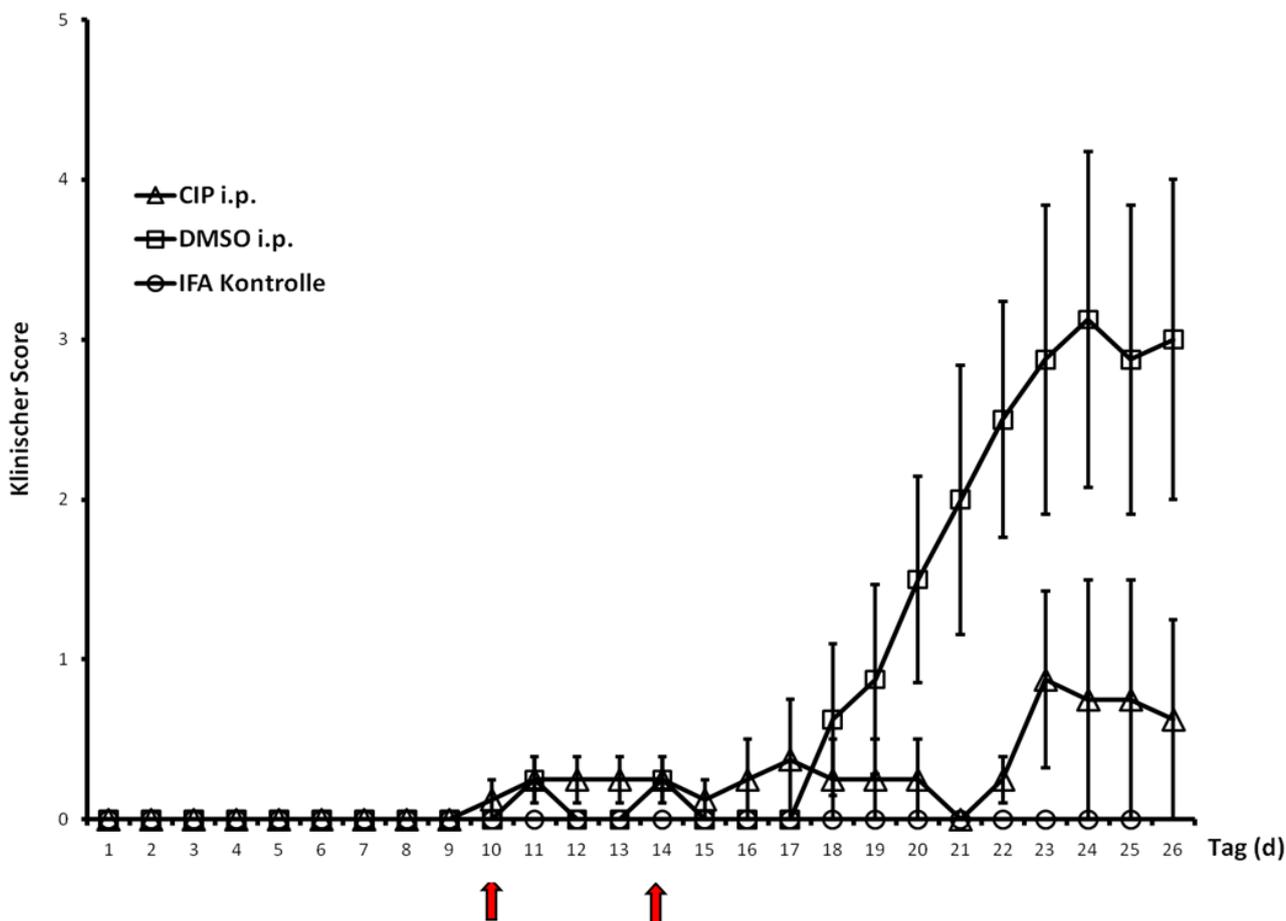
Zur Reinigung des CIP wurde die Induktion wie oben beschreiben durchgeführt. Dann wurden die Zellen wie in Material und Methoden beschrieben lysiert und über eine Säule aus Sepharose 4B nach Herstellerprotokoll zuerst gebunden und anschließend mit Hilfe von Thrombin das GST Protein und das CIP voneinander getrennt. Das Thrombin wurde gleich im Anschluss durch eine Benzamidine Agarose enthaltende Säule vom eluierten Protein getrennt und das CIP in PBS zur weiteren Verwendung aufbewahrt.



**Abb. 25: Säulenreinigung und Eluierung von CIP**

Abbildung a) zeigt eine SDS-page bei verschiedenen Abschnitten der CIP Aufreinigung. Bahn 1 und 2 zeigen CIP-GST nach Lyse der entsprechend induzierten E. coli Bakterien, Bahn 3 und 4 zeigen die CIP-GST Bande bei 38,5 kDa nach Zentrifugation im Überstand. Die Untersuchung des Zellpellets in Bahn 5 zeigt kein CIP-GST. Bahn 6 und 7 zeigen den Durchfluss nach Überschichten der Sepharose 4B Säule mit dem CIP-GST haltigen Überstand nach Zentrifugation. Es zeigt sich kein CIP-GST typische Bande im Durchfluss, so dass davon ausgegangen wurde, dass GST mit CIP an die Säule gebunden wurde. Abbildung b) zeigt den Durchfluss nach Thrombin Spaltung von CIP-GST und nach der Thrombin – CIP Trennung durch erneute Säulenreinigung an Benzamidine-Agarose mit PBS. Es zeigt sich eine isolierte Bande bei 12,5 kDa dem CIP entsprechend.

### 3.7. Behandlung von MOG induzierten LEW.1N Ratten mit dem CDK5 Inhibitor Protein durch intraperitoneale (i.p.) Applikation



**Abb. 26: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.p. Applikation von CIP bei LEW.1N**

Auf der X-Achse sind die Tage nach MOG Immunisierung aufgetragen, die Y-Achse zeigt den klinischen Krankheitscore. Die Kurven zeigen den Krankheitsverlauf der Tiere an den einzelnen Tagen (+/- SEM). Die Behandlungsgruppe wurde an Tag 10 und 14 (rote Pfeile) mit CIP i.p. (Dreiecke) (n = 4), die Behandlungskontrolle mit DMSO i.p. (Vierecke) (n=4) behandelt. Eine weitere Kontrolle wurde nicht MOG immunisiert, sondern mit IFA alleine und wie oben mit CIP i.p. behandelt (Kreise) (n=4). Der Unterschied der Gruppen wurde über die AUC ermittelt ( $p = 0,03$ ).

Zur weiteren Untersuchung wurde das CIP in PBS gelöst und wie schon zuvor in Material und Methoden beschrieben den MOG induzierten LEW.1N Ratten i.p. appliziert. Zur Immunisierung wurde auch in diesem Experiment IFA genutzt um die Schwere des Krankheitsverlaufes der LEW.1N Ratten abzumildern. Die Gabe erfolgte an Tag 10 und 14 nach Immunisierung in einem therapeutischen Behandlungsregime. Dann wurde erneut der klinische Krankheitsverlauf beo-

bachtet und dokumentiert. Die Gruppen wurden über die AUC statistisch verglichen.

Abb. 26 zeigt den unterschiedlichen Krankheitsverlauf der 3 Gruppen. In der CIP behandelten Gruppe erkrankten nur 2 von 4 Tieren, mit einem max. Krankheitsscore von 1,67 (+/- 1,26 SD), wohingegen in der DMSO behandelten Gruppe 3 von 4 Tieren erkrankten und einen max. Krankheitsscore von 3,25 (+/- 1,85 SD) aufwiesen. Die Gruppe die mit IFA immunisiert und mit CIP behandelt wurde zeigte bei keinem Tier Anzeichen einer EAE. Der Krankheitseintritt war bei beiden Behandlungsgruppen zwischen Tag 16 und 18. Der Vergleich aller Gruppen im ANOVA ergab einen Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,03$ ). Man konnte einen signifikanten Unterschied zwischen der DMSO behandelten Gruppe zur nicht MOG immunisierten Gruppe zeigen ( $p = 0,03$ ). Zwischen der CIP behandelten Gruppe und der IFA Kontrolle zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,1$ ).

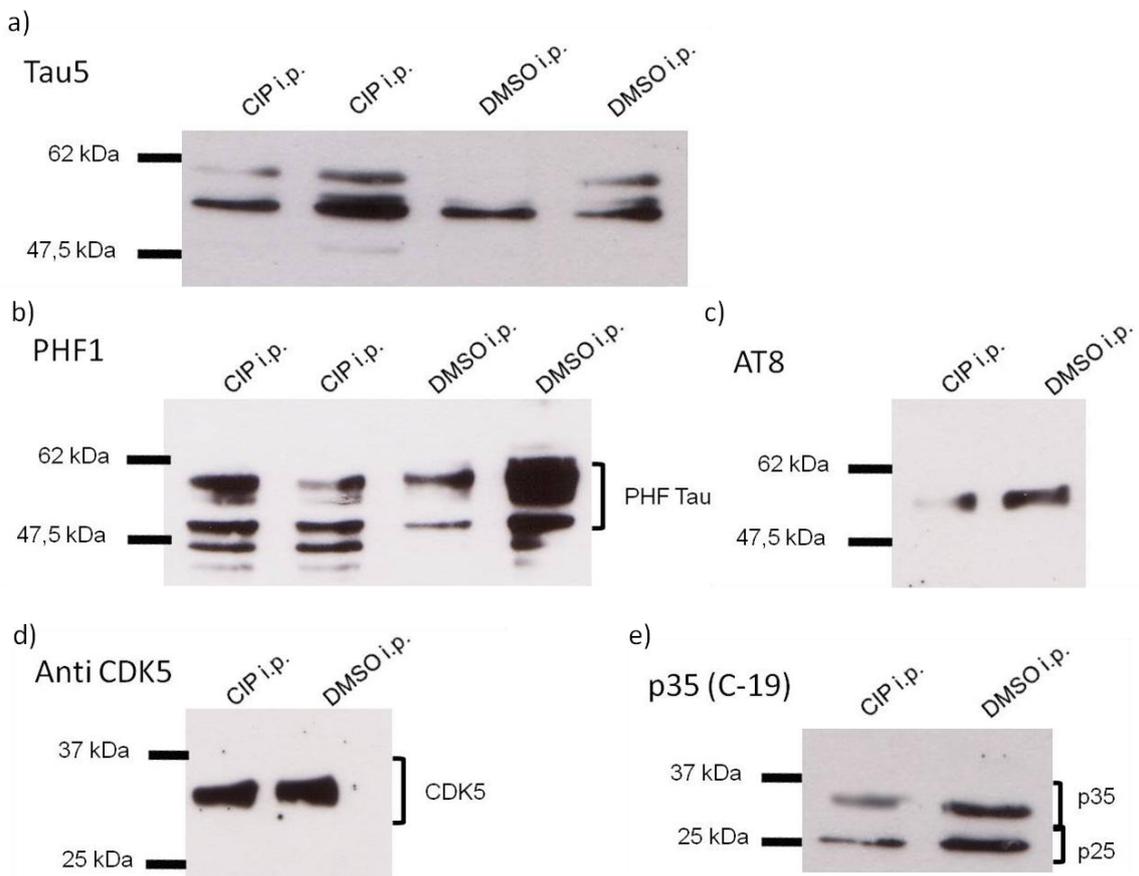
Auch der Vergleich der CIP behandelten Gruppe zur DMSO behandelten Gruppe ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,1$ ).

Stamm	Immuni- sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Score MEAN	Standard- abweichung (+/- SD)	Tag des Krankheits- eintritts (+/- SD)
LEW. 1N	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl IFA	CIP 10mg / kgKG R- Rosco/10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	4	2/4	1,67	+/- 1,26	16,8 (+/-6,66)
LEW. 1N	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl IFA	10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	4	3/4	3,25	+/- 1,85	17,5 (+/- 3,42)
LEW.1N	100 µl PBS + 100 µl IFA	CIP 10mg / kgKG/10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	4	0/4	0	0	-----

**Tab.7: Deskriptive Statistik bei therapeutischer i.p CIP Behandlung von LEW.1N Ratten**

### 3.7.1 Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau bei CIP behandelten LEW.1N Ratten

Zur Untersuchung auf hyperphosphoryliertes Tau wurden die Proben wie oben beschrieben vorbereitet und Western Blots durchgeführt. Abb. 27 zeigt die durchgeführten Blots. Es zeigte sich bei der Detektion von Gesamt Tau mit Tau5 kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 27a). Bei den Blots mit den spezifischen Antikörpern PHF1 und AT8 gegen hyperphosphoryliertes Tau zeigte lediglich AT8 einen geringen Unterschied zwischen CIP behandelter Gruppe und DMSO Kontrolle (Abb. 27c). Weiter konnte CDK5 in beiden Gruppen gleich detektiert werden. Eine vermehrte Spaltung von p35 zu p25 konnte nicht gezeigt werden (Abb. 27e).

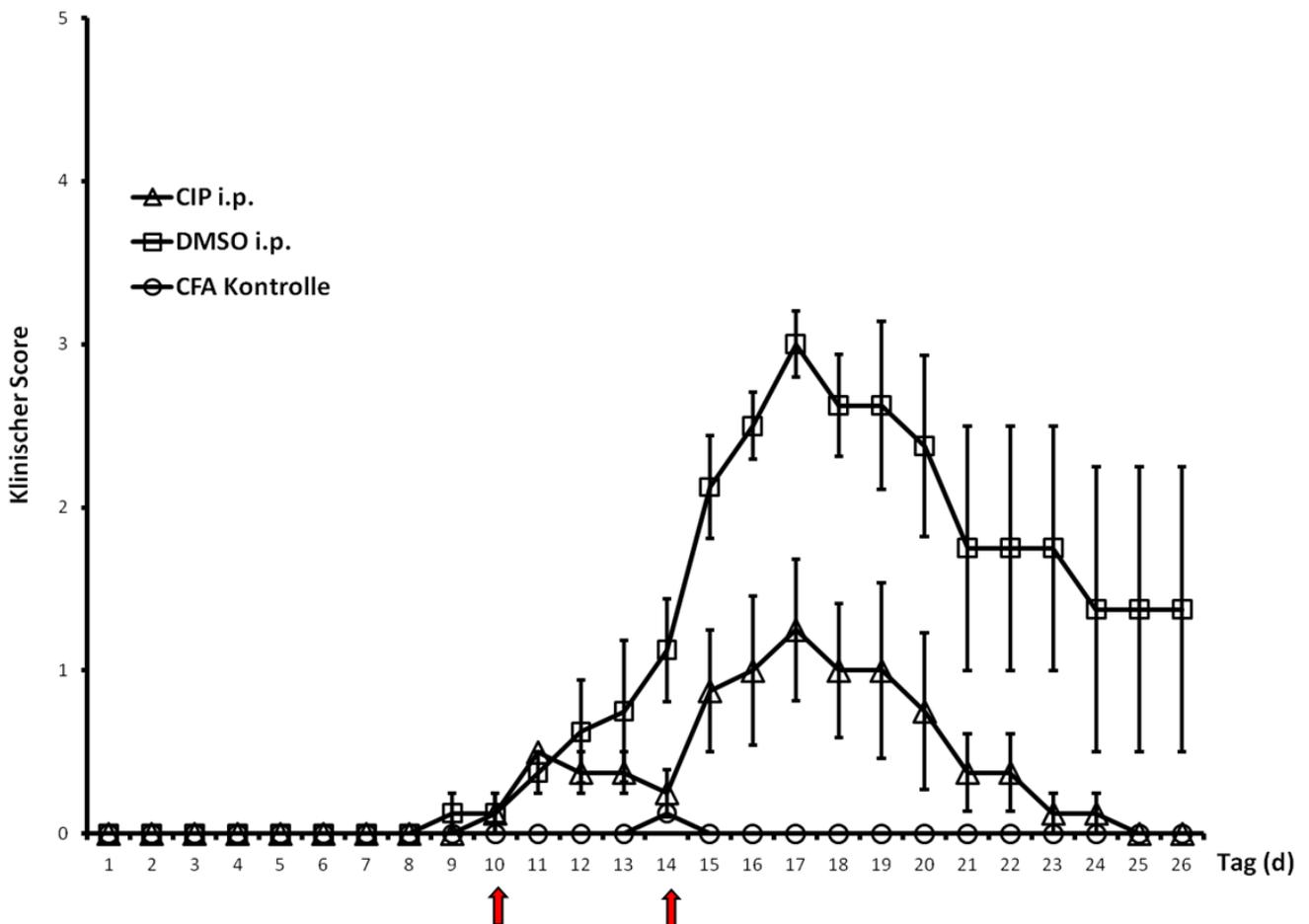


**Abb. 27: Western Blot bei LEW.1N nach MOG Immunisierung und therapeutischer intraperitonealer CIP Applikation**

Grafik a) zeigt keinen Unterschied in der Detektion von Gesamt Tau mit Tau 5; Grafik b) und c) zeigen lediglich bei AT8 einen geringen Unterschied zwischen CIP und DMSO behandelter Gruppe. Grafik d) und e) zeigen bei gleicher Detektion von CDK5 keinen wesentlichen Unterschied in der Menge von p35 und p25.

### 3.8. Behandlung von MOG induzierten LEW.1AV1 Ratten mit dem CDK5 Inhibitor Protein durch intraperitoneale (i.p.) Applikation

Wie im Versuch 3.7. beschrieben wurden jetzt LEW.1AV1 Ratten MOG immunisiert und in 3 Gruppen (jeweils  $n = 4$ ) geteilt. Es erfolgte die Behandlung mit CIP oder DMSO i.p. am Tag 10 und 14 nach Immunisierung als therapeutisches Behandlungsregime. Die 3. Gruppe wurde nur mit CFA immunisiert und mit CIP i.p. behandelt. Es wurden wiederum Gewicht und klinischer Score überwacht und die AUCs statistisch verglichen.



**Abb. 28: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.p. Applikation von CIP in LEW.1AV1**

Auf der X-Achse sind die Tage nach MOG Immunisierung aufgetragen, die Y-Achse zeigt den klinischen Krankheitsscore. Die Kurven zeigen den Krankheitsverlauf der Tiere an den einzelnen Tagen ( $\pm$  SEM). Die Behandlungsgruppe wurde an Tag 10 und 14 (rote Pfeile) mit CIP i.p. (Dreiecke) ( $n = 4$ ), die Behandlungskontrolle mit DMSO i.p. (Vierecke) ( $n=4$ ) behandelt. Eine weitere Kontrolle wurde nicht MOG immunisiert, sondern mit CFA alleine und wie oben mit CIP i.p. behandelt (Kreise) ( $n=4$ ). Der Unterschied der Gruppen wurde über die AUC ermittelt ( $p = 0,007$ ).

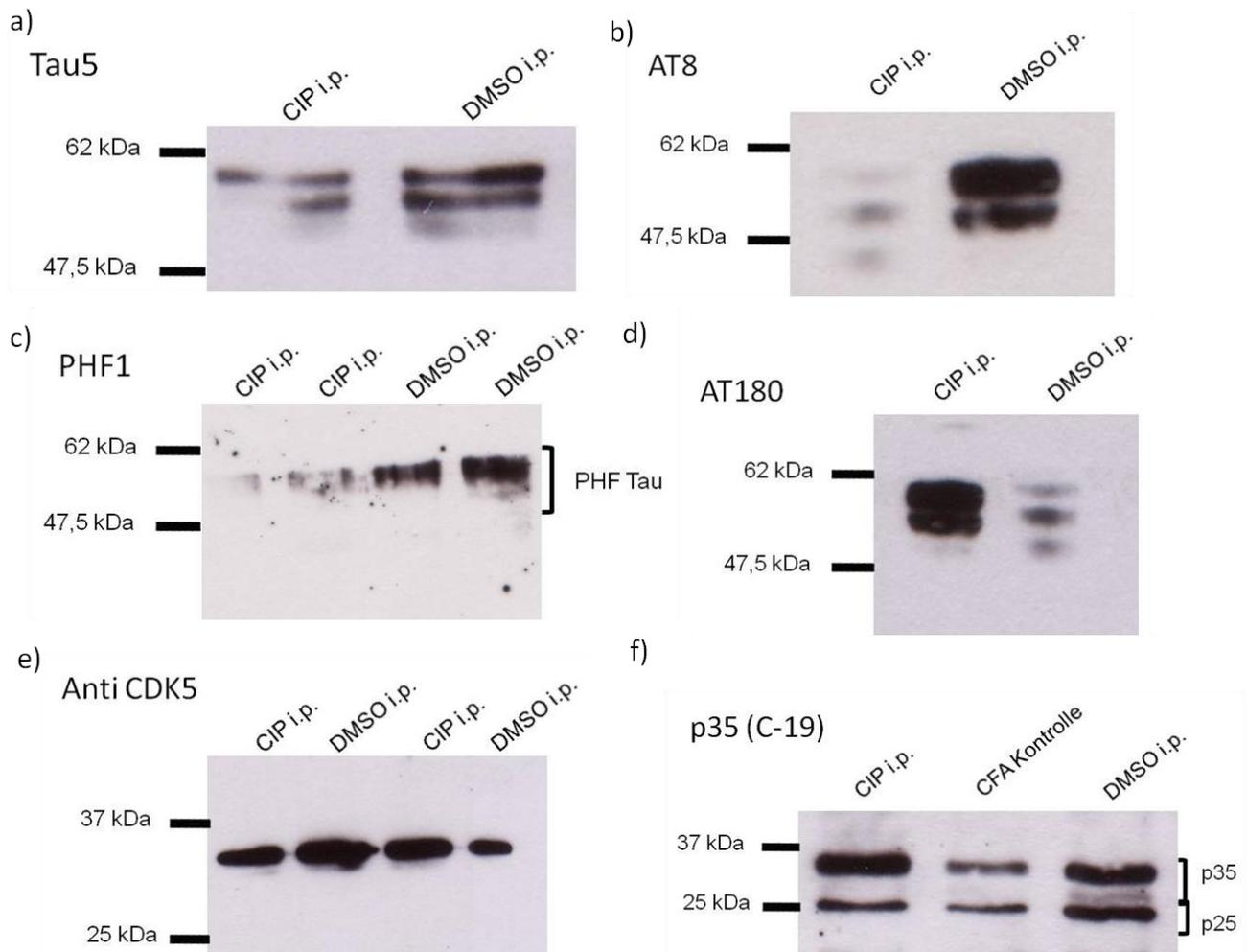
Es zeigte sich der gewohnt mildere Verlauf der EAE bei den LEW.1AV1 Ratten mit einem Krankheitsmaximum um den Tag 17 und einem Abklingen der Erkrankung zum Tag 26. Von den CIP behandelten Tieren erkrankten 3 von 4, von den DMSO behandelten Tieren erkrankten alle 4 Tiere, von den nicht immunisierten Kontrollen erkrankte kein Tier. Die DMSO behandelten Tiere zeigten einen schwereren EAE Verlauf als die mit CIP behandelte Gruppe mit einem max. Krankheitsscore von 2,83 (+/- 0,29 SD) in der DMSO gegenüber 1,5 (+/- 0,91 SD) in der CIP-Gruppe.

Statistisch zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Gruppen ( $p = 0,007$ ). Im Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander zeigten sich dann signifikante Unterschiede zwischen DMSO behandelter Gruppe und CFA Kontrolle ( $p = 0,01$ ), sowie zwischen CIP behandelter Gruppe und CFA Kontrolle ( $p = 0,02$ ). Zwischen der CIP und der DMSO Behandlung konnte kein statistischer Unterschied gezeigt werden ( $p = 0,06$ ).

Stamm	Immuni- sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Score MEAN	Standard- abweichung (+/- SD)	Tag des Krankheits- eintritts (+/- SD)
LEW.1AV1	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	CIP 10mg / kgKG/10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	4	3/4	1,5	+/- 0,91	9,75 (+/-0,5)
LEW.1AV1	50µg rrMOG <sub>1-125</sub> in 100µl PBS + 100 µl CFA	10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	4	4/4	2,83	+/- 0,29	10,25 (+/- 2,06)
LEW.1AV1	100 µl PBS + 100 µl CFA	CIP 10mg / kgKG/10µl DMSO + 490µl NaCl 0,9% i.p.	4	0/4	0,17	+/- 0,29	-----

**Tab. 8: : Deskriptive Statistik bei therapeutischer i.p CIP Behandlung von LEW.1AV1 Ratten**

### 3.8.1 Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau bei CIP behandelten LEW.1AV1 Ratten



**Abb. 29: Western Blot bei LEW.1AV1 nach MOG Immunisierung und therapeutischer intraperitonealer CIP Applikation**

Grafik a) zeigt keinen Unterschied in der Detektion von Gesamt Tau mit Tau 5; Grafik b) – d) zeigen mit den AK AT8 und PHF1 eine vermehrte Hyperphosphorylierung von Tau in der DMSO behandelten Gruppe, wohingegen der AK AT180 eine Hyperphosphorylierung von Tau in der CIP behandelten Gruppe zeigt. Grafik e) und f) zeigen bei gleicher Detektion von CDK5 keinen wesentlichen Unterschied in der Menge von p35 und p25 in allen 3 Gruppen.

Zur Untersuchung auf hyperphosphoryliertes Tau wurden die Proben wie oben beschrieben vorbereitet und Western Blots durchgeführt. Abb. 29 zeigt keinen Unterschied beim Gesamt Tau (Abb. 29a). Die spezifischen Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau zeigen kontroverse Ergebnisse. Während AT8 und PHF1 eine vermehrte Hyperphosphorylierung von Tau bei der DMSO behandelten Gruppe zeigen, wurde mit AT 180 hyperphosphoryliertes Tau in der CIP

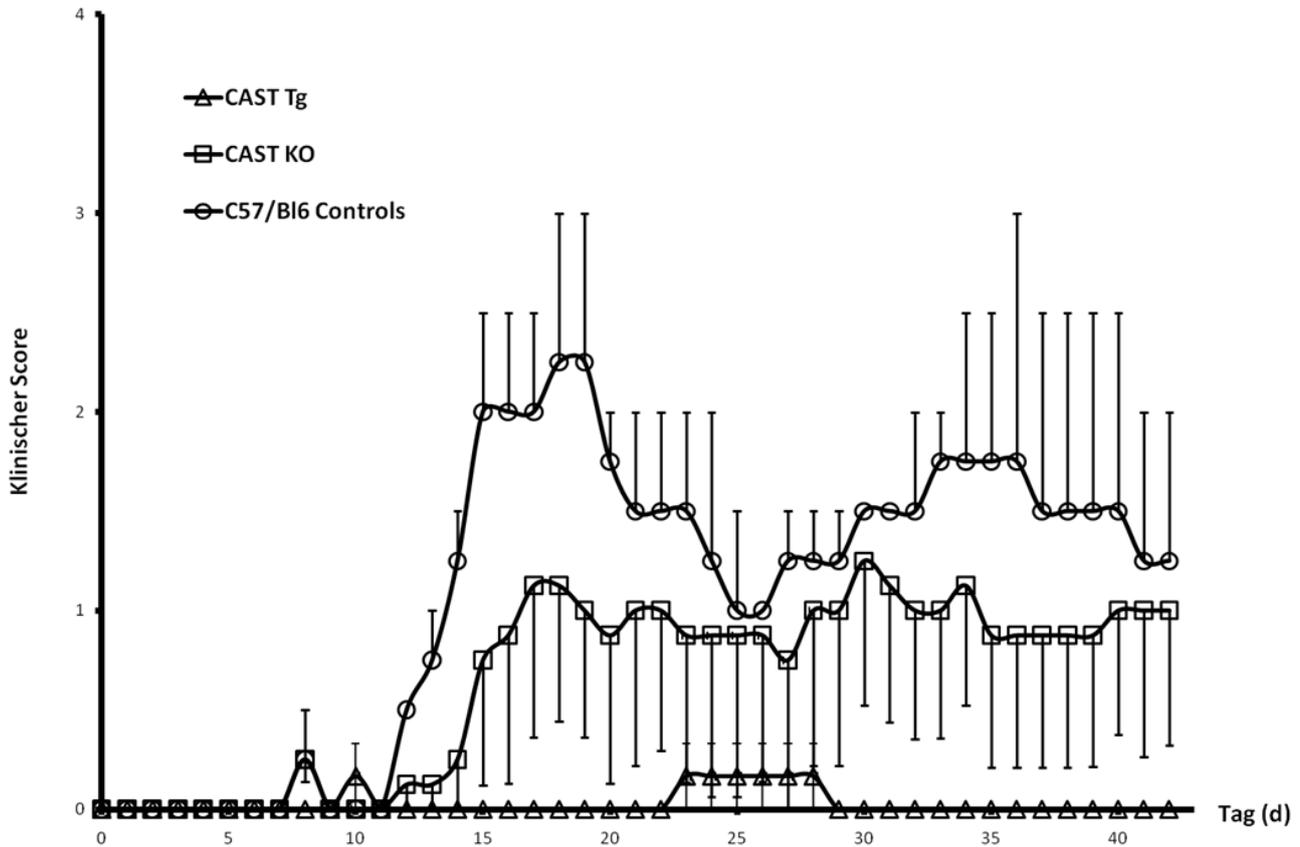
behandelten Gruppe detektiert (Abb. 29b-d). Bei der Menge von CDK5 sowie der Spaltung von p35 nach p25 konnten keine deutlichen Unterschiede detektiert werden (Abb. 29e-f).

### **3.9. Induktion einer EAE in Calpastatin (CAST - Tg) transgenen und Calpastatin knockout (CAST- KO) C57/Bl6 Mäusen**

Eine weitere natürliche Form der CDK5 Inhibierung wird durch das endogene Calpastatin bewirkt, das eine Hemmung der CDK5 Aktivität bewirken kann. Um weiter auf eine mögliche Rolle von CDK5 in der EAE hinzudeuten, wurde versucht bei Calpastatin transgenen, sowie Calpastatin KO C57/Bl6 Mäusen eine EAE zu induzieren. Als Kontrolle dienten C57/Bl6 Mäuse. Die Immunisierung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben mit 50µg MOG-Peptid<sub>35-55</sub> in CFA immunisiert und mit 150ng Pertussistoxin am Tag der Immunisierung und 48h danach geboostet. Dann wurden die Mäuse täglich nach Gewicht und klinischem Score beurteilt.

In Abb.30 zeigt sich die mögliche Induktion einer EAE in den C57/Bl6 Mäusen (n=2) mit einem Erkrankungsmaximum um den Tag 17 mit einem max. Score von 2,25 (+/- 1,06 SD) und einer 2. Krankheitsphase um den Tag 32. Beide Tiere erkrankten. Bei den C57/Bl6 CAST-KO Mäusen (n=4) konnte bei 3 von 4 Tieren eine milde Form der EAE beobachtet werden. Insgesamt variierte der Krankheitseintritt aber sehr stark von Tag 12 bis Tag 28. Der max. Krankheits-score betrug 1,67 (+/- 1,35 SD). Bei den C57/Bl6 CAST-Tg Mäusen ließ sich keine EAE-Symptomatik zeigen.

In der statistischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 Gruppen ( $p = 0,3$ ).



**Abb.30: Krankheitsverlauf nach MOG<sub>35-55</sub> Immunisierung bei C57/BL6, C57/BL6 CAST-KO und C57/BL6 CAST-Tg Mäusen**

Auf der X-Achse sind die Tage nach MOG Immunisierung aufgetragen, die Y-Achse zeigt den klinischen Krankheitsscore. Die Kurven zeigen den Krankheitsverlauf der Tiere an den einzelnen Tagen (+/- SEM). Die Immunisierung der C57/BL6 Mäuse zeigt den schwersten Verlauf (Kreise) (n=2). Bei den C57/BL6 CAST-KO Mäusen konnte eine milde EAE induziert werden (Vierecke) (n=4). Die C57/BL6 CAST-Tg Mäuse erkrankten nicht an einer EAE (Dreiecke) (n=3). Die Gruppen wurden statistisch über die AUC verglichen und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen (p = 0,3).

## Ergebnisse

---

Stamm	Immuni- sierung	Behandlung	Anzahl n	Erkrankte Tiere	Max. Score MEAN	Standard- abweichung (+/- SD)	Tag des Krankheits- eintritts (+/- SD)
C57/BI CAST-Tg	50µg MOG- Peptide 35-55 / 100µl PBS + 100µl IFA + 400µg M.t.	----- --	3	0/3	0,33	+/- 0,29	23,5 (+/- 0,71)
C57/BI CAST-KO	50µg MOG- Peptide 35-55 / 100µl PBS + 100µl IFA + 400µg M.t.	-----	4	¾	1,67	+/- 1,35	21,25 (+/- 9,07)
C57/BI	50µg MOG- Peptide 35-55 / 100µl PBS + 100µl IFA + 400µg M.t.	----- -	2	2/2	2,25	+/- 1,06	12 (+/- 0)

**Tab.9: Deskriptive Statistik bei der MOG induzierten EAE von C57/BI CAST-Tg, CAST-KO oder Kontrollmäusen**

## 4 Diskussion

### 4.1 Induktion einer EAE in verschiedenen Rattenstämmen und Untersuchung auf hyperphosphoryliertes Tau und das p35 Spaltprodukt p25

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die pharmakologische Verminderung der Tau Hyperphosphorylierung zu einer Reduktion der Axonpathologie und damit zu einer Milderung der klinischen Symptomatik bei der EAE führen kann. Hierzu wurde zunächst wie in Material und Methoden beschrieben bei den Rattenstämmen LEW.1N und LEW.1AV1 durch Immunisierung mit dem MOG Peptid<sub>1-125</sub> in komplettem Freund's Adjuvans versucht eine EAE auszulösen. Dies gelang nach den üblichen Protokollen korrespondierend zu zahlreichen Veröffentlichungen. Die beiden Rattenstämme zeigten dabei einen grundlegend unterschiedlichen Krankheitsverlauf, wie bereits 1998 von Weissert et al. beschrieben (Weissert et al., 1998). Hier wurde gezeigt, dass die Suszeptibilität der Tiere für eine EAE abhängig vom MHC Haplotyp ist. Wie in den damals durchgeführten Experimenten entwickelten auch in dieser Arbeit die LEW.1N Ratten einen akut progredienten schweren Krankheitsverlauf mit Para- und Tetraplegie, mit einem Erkrankungseintritt um den Tag 10 -12 und einem Erkrankungsmaximum zwischen Tag 13 und 15 (Abb. 8, Tab. 1). Die LEW.1AV1 Ratten hingegen entwickelten einen chronischen Krankheitsverlauf mit einem schleichenden Krankheitsbeginn und einem mildereren Verlauf mit einer Paraplegie der Hinterbeine als Erkrankungsmaximum (Abb. 9, Tab. 2), welche sich bei längerer Beobachtungsdauer, wie von Weissert et al. beschrieben im Sinne einer chronisch schubförmigen Erkrankung, auch wieder zurückbilden kann. Alle MOG immunisierten Tiere erkrankten an einer EAE und wiesen im Vergleich zu den Kontrollgruppen auch einen signifikanten Unterschied im Krankheitsverlauf auf (LEW.1N vs. Kontrollen,  $p < 0,01$ ; LEW. 1AV1 vs. Kontrollen,  $p < 0,05$ ). Zum Nachweis von Tau wurden verschiedene Antikörper genutzt, die gegen pathologische Phosphorylierungsstellen des Tau Proteins gerichtet sind. Wie in der Einleitung schon beschrieben, wird das Tau Protein bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen hyperphosphoryliert und in bestimmter Polyme-

risation als „Straight filaments“ (SF) oder „Paired helical filaments“ (PHF) vorgefunden (Kidd, 1963). Dieses PHF Tau ist um ein mehrfaches stärker phosphoryliert, als das Tau bei gesunden Gehirnen (Kenessey und Yen, 1993). Die in den Western Blots genutzten Antikörper richten sich gegen PHF Tau (AT 8 – phosphoryliertes Ser202; AT180 - phosphoryliertes Thr231, AT100 – phosphoryliertes Ser212 und Thr 214, PHF1 – phosphoryliertes Ser396 und Ser 404) und detektieren nur schwach oder gar kein unverändertes Tau. Zum Nachweis von unverändertem Tau wurde der Antikörper Tau5 genutzt, der Tau zwischen 52-68 kDa detektiert. Wie schon gezeigt werden konnte, kommt diese Art von Hyperphosphorylierung des Tau Proteins auch in Maus- und Rattenmodellen der EAE vor (Schneider et al., 2004; Anderson et al., 2008). Eine mögliche Kinase, die diese Hyperphosphorylierung in vivo bewirken kann, ist die CDK5. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die CDK5 Tau hyperphosphorylieren kann (Paudel et al., 1993, Patrick et al., 1999) und dabei mit einer Neuro- und Axondegeneration einhergeht. Die CDK5 wird dabei ihrerseits durch eine p35/p25 Spaltung verstärkt aktiviert (Patrick et al., 1999; Ahlijanian et al., 2000; Bian et al., 2002; Lee et al., 2000). In unseren Western Blots konnte wie in Abb. 10 gezeigt, im Großhirn der an EAE erkrankten LEW.1N Ratten bei normaler Menge Gesamt Tau Protein (detektiert durch Tau5) eine vermehrte Hyperphosphorylierung von Tau durch die Antikörper AT8 und AT180 gezeigt werden. Der Antikörper PHF1 zeigte hingegen in beiden Gruppen eine Hyperphosphorylierung von Tau. Weiterhin konnte eine vermehrte Spaltung von dem CDK5 aktivierenden p35 zur aktiveren Form p25 bei der an EAE erkrankten Gruppe dargestellt werden. Insgesamt deckt sich dieses Ergebnis mit der Arbeit von Schneider et al. 2004. Zusätzlich hierzu zeigen neuere Arbeiten, dass auch p35/CDK5 ein hohes Potential zu Tau Phosphorylierung besitzt und dass es in der in vitro Kinetik zwischen p25/CDK5 und p35/CDK5 keinen Unterschied zu geben scheint (Peterson et al., 2010). Dies könnte bedeuten, dass auch die Gesamtmenge an p35 eine bedeutende Rolle für die CDK5 Aktivierung und den Pathomechanismus spielen könnte.

Auch bei den LEW.1AV1 Tieren mit einem chronischen EAE Verlauf, konnte eine Hyperphosphorylierung von Tau mit den Antikörpern AT180 und AT8, nicht

hingegen mit dem Antikörper PHF1 gezeigt werden. Auch eine Spaltung von p35 zu p25 wurde entsprechend obigen Ergebnissen detektiert. Insgesamt könnte mit einer quantitativen Bestimmung der Hyperphosphorylierung von Tau und dem immunhistochemischen Nachweis eine genauere Beleuchtung des zugrundeliegenden Mechanismus erfolgen. Interessant wäre dabei auch eine Aktivitätsmessung der CDK5 um eine detailliertere Aussage über die *in vivo* Kinetik und den Zusammenhang von CDK5 und seinen Aktivatoren p25 und p35 zu erhalten. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Hyperphosphorylierung von Tau auch in nicht vernachlässigbarem Ausmass durch andere, seit langem bekannte Kinasen, welchen Tau als Substrat dient, bewirkt wird (Pierre und Nunez, 1983; Steiner et al., 1990; Drewes et al., 1992; Hanger et al., 1992). In diesem Fall könnte die CDK5 nur eine leicht erhöhte, oder aber keine disregulierte Aktivität zeigen. Dennoch deutet die aktuelle Studienlage auf eine entscheidende Rolle der CDK5 in der Neuron- und Axondegeneration hin, was neben der bekannten Tau Hyperphosphorylierung (Lopes und Agostinho, 2011), unter anderem auch durch eine Hyperphosphorylierung von Neurofilament Proteinen vermittelt werden könnte (Zhou et al., 2010). Diese anderen Signalwege könnten im Weiteren als potentielle pathologische Mechanismen bei der EAE untersucht und beeinflusst werden.

#### **4.2. Behandlung der MOG induzierten EAE bei LEW.1N Ratten mit Roscovitine i.p. und i.t.**

Um den Einfluss der CDK5 Aktivierung auf die klinische Ausprägung der EAE und auf die Hyperphosphorylierung von Tau zu untersuchen, wurde bei den LEW.1N Tieren eine Behandlung mit einem kommerziellen CDK5 Inhibitor durchgeführt. In anderen Arbeiten konnte schon gezeigt werden, dass eine Calpain Regulation und damit verminderte Spaltung von p35/p25 zu einer Verminderung der CDK5 Aktivität führt und z.B. das spezifisch CDK5 Inhibitor Protein in Zellkulturen die Apoptose von Neuronen reduzieren konnte (Zheng et al., 2005). Weiterhin konnte die Applikation von Calpain Inhibitoren den klinischen Verlauf einer EAE bei C57/Bl6 Mäusen positiv beeinflussen (Hassen et al.,

2006). Die CDK5 Inhibition wäre folglich ein möglicher Ansatz in den Krankheitsverlauf einzugreifen, um trotz einer Überaktivierung von Calpainen, wie sie zuletzt im Rückenmarkzellen von Ratten in verschiedenen Stadien der EAE gezeigt wurde (Karpenko et al., 2011), eine Tauphosphorylierung und Axonpathologie zu vermeiden. Die beschriebene Spaltung von p35 zu p25 könnte hierdurch ohne Effekt bleiben und damit einen geringeren bleibenden Grad der Beeinträchtigung bei der EAE ermöglichen. Weiterhin konnte in einem in vitro und in vivo Modell der Alzheimer Krankheit gezeigt werden, dass neben der Neurodegeneration auch die Neurogenese durch eine veränderte CDK5 Aktivität verändert war und dass sich dieser Effekt durch die Applikation von Roscovitine rückgängig machen ließ (Crews et al., 2011).

In unseren Versuchen konnte in einem prophylaktischen Ansatz mit der i.p. Gabe von R-Roscovitine alle 48h i.p. kein Unterschied zu den Kontrolltieren dargestellt werden (Abb. 12). Aufgrund des heftigen Krankheitsverlaufs der EAE bei LEW.1N Ratten und damit einhergehenden extrem kurzen Beobachtungsdauer, änderten wir die Versuchsanordnung durch Immunisierung der LEW.1N Ratten mit IFA, um auch bei diesem Stamm eine langsamer progredient verlaufende EAE auszulösen. Zusätzlich hierzu wurde eine Gruppe gebildet, die nicht MOG immunisiert, aber mit R-Roscovitine i.p. behandelt wurde, um Nebenwirkungen der Behandlung beurteilen, bzw. ausschließen zu können. In Abb. 13 zeigt sich der Krankheitsverlauf nach IFA Immunisierung im Vgl. zu der bisherigen Immunisierung mit MOG und CFA deutlich abgemildert, was einen längeren Beobachtungszeitraum ermöglichte. Bei der R-Roscovitine behandelten Gruppe erkrankten außerdem nur 2 von 4 Tieren, wohingegen bei der DMSO-Kontrollgruppe alle Tiere erkrankten. Auch die Schwere der Erkrankung wurde günstig beeinflusst bei einem max. Krankheitsscore von 1,25 (+/- 1,19 SD) in der behandelten, gegenüber 3,25 (+/- 0,65 SD) in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse waren aufgrund der geringen Fallzahl (n=4 pro Gruppe) statistisch nicht ausreichend aussagekräftig ( $p = 0,05$  zwischen R-Roscovitine und DMSO). Einen signifikanten Unterschied konnte man zwischen den MOG-immunisierten Tieren und den IFA Kontrollen zeigen ( $p < 0,05$ ). Dennoch zeigt die Applikation von R-Roscovitine einen beträchtlichen Effekt auf die Schwere

der Erkrankung, so dass Studien mit einer größeren Fallzahl angestrebt werden sollten, um den Effekt auch statistisch klar darzustellen.

Ob eine direktere Wirkung von R-Roscovitine auf das ZNS, ohne die bei i.p. Applikation notwendige Resorption und Verteilung des Wirkstoffes, den fulminanten Krankheitsverlauf der EAE bei LEW.1N Ratten abmildern kann, wurde durch die intrathekale Applikation von R-Roscovitine untersucht. Dabei konnte aber weder eine Änderung des Krankheitsverlaufes zum regulären fulminanten Krankheitsverlauf, noch ein Unterschied zur DMSO Kontrollgruppe gezeigt werden (Abb. 16, Tab.5). Interessanterweise zeigten aber alle Tiere in der Roscovitine i.t. behandelten Gruppe eine Tendenz sich am Tag 15 wieder zu erholen, wohingegen die DMSO behandelte Gruppe im Krankheitsscore weiter anstieg, was bei Betrachtung des mittleren Krankheitsscores am Tag 15 sogar statistische Relevanz zeigte ( $p < 0,05$ ).

Bei der oben beschriebenen Verbesserung der Symptomatik bei chronisch progredientem Verlauf der EAE bei LEW.1N Tieren ist eine Untersuchung größerer Fallzahlen notwendig, um eine statistische Aussage über die definitive Wirksamkeit einer R-Roscovitine Applikation treffen zu können. Als weiteres Problem der Versuche muss diskutiert werden in welcher Art- und Weise R-Roscovitine die Blut- Hirn- Schranke passiert und in welchen Konzentrationen das Roscovitine nach i.p. Applikation dann tatsächlich intrathekal, bzw. im ZNS wirksam wird. Zu diesen Fragestellungen wurden in dieser Arbeit keine klärenden Versuche durchgeführt, so dass die besagte Wirkung theoretisch auch andere Ursachen oder Angriffspunkte haben könnte. Menn et al. (Menn et al., 2010) konnten 2010 zeigen, dass ein intraperitoneal appliziertes S Isomer von Roscovitine (S-Roscovitine) bei Mäusen 3 h nach Induktion einer intrazerebralen Ischämie die Blut Hirn Schranke passieren kann. Geht man davon aus, dass bei Ischämien auch akute Entzündungsreaktionen auftreten, die die Blut-Hirn-Schranke durchlässiger für systemisch applizierte Substanzen machen, kann gefolgert werden, dass die Blut Hirn Schranke in der Entzündungsphase beim Eintritt der EAE durchlässig für R-Roscovitine ist. Dennoch könnten auch andere erst vor kurzem beschriebene Effekte einer CDK5 Inhibition durch Roscovitine, wie z.B. die verminderte Interaktion von Leukozyten mit Endothelien und

deren verminderte Auswanderung aus den Gefäßen (Berberich et al., 2011), eine Auswirkung auf die Ausprägung der EAE besitzen.

Die besagten Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein modulierender Effekt der EAE durch eine CDK5 Inhibition möglich ist und wie schon von anderen Autoren beschrieben, CDK5 Inhibitoren auch in vivo einen neuro- und axonprotektiven Effekt ausüben können (Zhang et al., 2004, Menn et al., 2010).

#### **4.3 Behandlung der MOG induzierten EAE bei LEW.1AV Ratten mit R-Roscovitine i.p.**

Um zu untersuchen, ob R-Roscovitine auch einen Effekt auf die EAE bei LEW.1AV1 Ratten hat, wurde wie schon bei den LEW.1N Ratten eine therapeutische i.p. Applikation von R-Roscovitine durchgeführt, mit den selben Einschränkungen der Methodik, die schon im vorherigen Abschnitt diskutiert wurden. Auch hier zeigte die Applikation des R-Roscovitine eine Modulation des Krankheitsverlaufes. Zwar erkrankten alle 4 Tiere an einer EAE, der max. Krankheitsscore war im Mittel mit 1,63 (+/- 1,11 SD) aber deutlich geringer als bei den DMSO kontrollierten Tieren, deren max. Mittelwert bei 3,13 (+/- 0,63 SD) lag (Tab. 6). Auch in dieser Untersuchung konnten die Ergebnisse bei einer Fallzahl von 4 nicht als statistisch signifikant bewertet werden. Wiederum zeigte sich nur ein statistischer Unterschied zwischen der MOG immunisierten vs. der CFA Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

Um auszuschließen, dass die Wirkung des Roscovitine peripher durch Modulation von Immunsystem und/oder Entzündung entsteht, wurde mit je 3 Tieren pro Gruppe ein IFN- $\gamma$  ELISPOT von Milzzellen durchgeführt. Die in Abb. 19 dargestellten Ergebnisse zeigen bei der Positivkontrolle mit ConA Stimulierung und der Negativkontrolle ohne Antigen in allen 3 Gruppen keinen statistischen Unterschied. Bei den korrekten Kontrollen konnte von einer korrekten Durchführung des ELISPOT ausgegangen werden. Die Restimulierung mit MOG<sub>1-125</sub> zeigte bei den erkrankten Tieren, wie bei der T-Zell vermittelten Immunantwort erwartet, einen deutlichen Anstieg der IFN- $\gamma$  Produktion, im Vergleich zu der CFA Kontrollgruppe (Abb. 18; \*  $p = 0,04$  ; \*\*  $p = 0,01$ ). Durch andere Antigene ließ sich bei keiner der Gruppen eine IFN- $\gamma$  Produktion stimulieren. Zwischen

der Behandlungsgruppe und der DMSO Kontrolle konnte kein signifikanter Unterschied in der Immunantwort detektiert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass R-Roscovitine zumindest nicht die T-Zell Antwort moduliert. Im Gegensatz hierzu konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass eine CDK5 Aktivierung in T-Zellen erforderlich ist, um eine EAE auszulösen. Pareek et al., beschreiben eine Aktivierung der CDK5 durch eine Aktivierung des T-Zellrezeptors in Lymphozyten und eine Resistenz gegen die Auslösung einer EAE bei chimären Mäusen, die in hämatopoetischen Zellen keine Gene zur CDK5 Expression besitzen. Weiterhin konnten auch der Transfer von enzephalitogenen T-Lymphozyten, denen die CDK5 oder die p35 Expression fehlte, keine EAE auslösen (Pareek et al., 2010). Ob noch andere Arten der peripheren Beeinflussung vorliegen, kann durch die durchgeführten Experimente nicht sicher ausgeschlossen werden. In jedem Fall war in unseren Experimenten keine Modulation der T-Zellantwort zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren nachzuweisen, so dass eher von einem Mechanismus ausgegangen werden kann, der nicht oder nur indirekt mit dem Immunsystem zusammenhängt. Deshalb wurde in den weiteren Versuchen durch die durchgeführten Western Blots erneut die CDK5 Wirkung auf p35/25 und hyperphosphoryliertes Tau beurteilt.

#### **4.4 Untersuchung auf hyperphosphoryliertes Tau und p35/25 nach der i.p. Behandlung mit R-Roscovitine bei LEW.1N und LEW.1AV1**

Um die Hyperphosphorylierung von Tau zu beurteilen wurden, wie schon oben beschrieben und diskutiert, Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen hyperphosphoryliertes Tau durchgeführt. Weiterhin wurde versucht durch den Nachweis des Spaltproduktes p25 nachzuweisen, ob der beschriebene Pathomechanismus mit CDK5 Überaktivierung, in Folge einer Calpain abhängigen Spaltung von p35 zu p25 (Patrick et al., 1998, Patzke und Tsai, 2002), auch in der EAE eine Rolle spielt und durch R-Roscovitine beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse waren kontrovers und lassen Spiel für weitere Interpretation. Bei den LEW.1N Tieren konnte mit den Antikörpern AT8 und PHF1 ein Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden. Die R-Roscovitine behandelte Gruppe

zeigte weniger hyperphosphoryliertes Tau, bei gleicher Gesamtmenge von Tau (Abb. 14). Weiterhin zeigte sich auch deutlich weniger Spaltprodukt p25. Bei den behandelten Tieren der LEW.1AV1 Gruppe zeigte sich hingegen deutlich mehr Spaltprodukt p25 und insgesamt kein Unterschied in der Menge des hyperphosphorylierten Tau in den einzelnen Gruppen. Dieser geringere Unterschied in der Tau phosphorylierung könnte mit der Art der Behandlung und dem chronischen Krankheitsverlauf der LEW.1AV1 Ratten zusammenhängen. Während bei den LEW.1N Tieren beide Injektionen des Roscovitine vor dem stärksten Krankheitseintritt erfolgten, erfolgte bei den LEW.1AV1 Tieren die 2. Roscovitine Applikation erst zum Erkrankungsmaximum, da ein früherer Anstieg der Erkrankung zu beobachten war. Dies könnte zur Folge haben, dass die Hyperphosphorylierung von Tau vor der 2. Roscovitine Applikation schon erfolgt war und deshalb kein Unterschied zwischen den Gruppen zu detektieren war. Weiter könnte der unterschiedliche genetische Hintergrund der Ratten Wirkung auf die Verteilung von Roscovitine im Kreislauf und auf das Abklingen der inhibitorischen Wirkung des Medikaments auf die CDK5 besitzen. Andererseits könnte es aber auch Hinweis darauf geben, dass eine Hyperphosphorylierung von Tau nicht zwangsläufig ursächlich für eine Axondegeneration ist, sondern wie schon vielfältig bei Modellen der Alzheimer Erkrankung diskutiert, ein Nebeneffekt der Axondegeneration darstellen könnte. Beiden Rattenstämmen war gemein, dass sich durch Behandlung mit Roscovitine die klinische Symptomatik gegenüber der Kontrollgruppe verbesserte. Interessanterweise konnte beispielsweise bei einem Mausmodell der HIV Encephalitis eine erhöhte CDK5 Aktivität, eine vermehrte Tau Phosphorylierung und ein Dendritenuntergang gezeigt werden. Der genetische knockdown von CDK5, aber auch die Applikation von R-Roscovitine verbesserten das kognitive Verhalten, die Neurodegeneration und reduzierten die Bildung von Astrozytennarben in diesem Mausmodell (Patrick et al., 2011). Dies gibt Hinweis, dass CDK5 in anderen neurodegenerativen und entzündlichen Geschehen eine Rolle für den neuronalen Zelluntergang spielt. Ob also ausschließlich die CDK5 Hemmung für die klinische Verbesserung verantwortlich ist, kann nach den Experimenten nicht abschließend geklärt werden. Dennoch gibt auch diese Arbeit Hinweis auf eine weitreichende

Rolle der CDK5 in neuronalem Zelluntergang. Zur näheren Differenzierung könnten histologische Schnitte angefertigt werden, um genauen Aufschluss über den Grad der Axondegeneration und der assoziierten Immunreaktion im Gehirn der behandelten gegenüber der unbehandelten Gruppe zu erhalten. Zur weiteren Beleuchtung des Pathomechanismus wäre auch ein direkter Nachweis der CDK5 und Calpain Aktivität nach R-Roscovitine Applikation möglich.

Da die Hemmung durch R-Roscovitine unspezifisch für den p35/CDK5 oder p25/CDK5 Komplex ist, wurden weitere Versuche durchgeführt um durch das p25/CDK5 spezifische CIP (Zheng et al., 2002) präzisere Ergebnisse zu erhalten.

### **4.5 CIP Expression und Reinigung**

Um die weiteren Experimente mit der i.p. Behandlung durch CIP durchführen zu können, wurde das CIP aus CIP Vektoren extrahiert, kloniert und gereinigt. CIP konnte dabei in PBS gelöst werden und stand damit zur intraperitonealen Anwendung zur Verfügung (Abb. 21-25). Die Wirkungsweise von CIP wurde von Zheng et al. bereits 2002 beschrieben. Weitere Arbeiten beschreiben eine spezifische Hemmung der p25/CDK5 Aktivität in der L-Dopa induzierten Dyskinesie bei einem Rattenmodell der Parkinson Erkrankung (Quan et al., 2010), sowie eine Hemmung der Tau Hyperphosphorylierung (Zheng et al., 2005). Die genaue Interaktion von CIP mit p25/CDK5 wurde von Cardone (Cardone et al., 2010) erneut diskutiert. Wie beim Versuch mit R-Roscovitine wurden keine Tests durchgeführt, die die Liquorgängigkeit von CIP überprüften, so dass eine definitive intrazerebrale Wirkung nicht bewiesen werden kann; es konnte aber auch hier bei der entzündlichen Komponente der EAE davon ausgegangen werden, das CIP nach intrathekal penetriert.

Als Behandlungsschema wurde das therapeutische Schema mit einer i.p. Applikation am Tag 10 und am Tag 14 gewählt, das bei den R-Roscovitine Applikation vielversprechende Ergebnisse zeigte. Die Dosierung wurde der entsprechenden R-Roscovitine Dosierung nachempfunden; es sollten aber auch hier zur weiteren Evaluierung und therapeutischen Anwendung von CIP in vivo Ex-

perimente zu Ermittlung einer Dosis Wirkungs Beziehung und zur Ermittlung der Liquorgängigkeit durchgeführt werden.

#### **4.6 Behandlung der MOG induzierten EAE bei LEW.1N und LEW.1AV Ratten mit CIP i.p.**

Die Behandlung der beiden Rattenstämme erfolgte analog zu der R-Roscovitine Behandlung, wobei die MOG Immunisierung der LEW.1N Ratten zur besseren Beurteilbarkeit des Krankheitsverlaufes erneut mit IFA durchgeführt wurde. Sowohl bei den LEW.1N, als auch bei den LEW.1AV1 Ratten konnte durch die CIP Applikation eine Modulation der EAE erreicht werden (Abb. 26 und Abb.28). In der LEW.1N Gruppe erkrankten nur 2 von 4 Tieren mit einem max. Krankheitsscore von 1,67 (+/- 1,26 SD), wohingegen in der Kontrollgruppe 3 von 4 Tieren mit einem max. Score von 3,25 (+/- 1,85 SD) erkrankten. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant, was unter anderem an der geringen Fallzahl der Gruppen (n = 4) liegen kann. Auch in der LEW.1AV1 Gruppe erkrankten von den behandelten Tieren nur 3 von 4 und wiesen im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit 1,5 (+/- 0,91 SD) gegen 2,83 (+/- 0,29 SD) einen niedrigeren max. Krankheitsscore auf. Auch hier konnten die Ergebnisse nicht als statistisch signifikant bewertet werden. Dennoch zeigen beide Ergebnisse wie schon im Roscovitine Versuch einen klaren Unterschied zwischen den beiden Gruppen und geben erneut Hinweis auf den Nutzen der CDK5 Inhibition in der EAE. Bei den Kontrollgruppen, die CIP i.p. behandelt wurden, ohne vorher MOG immunisiert zu werden, zeigten sich keine Krankheitssymptome oder irgendein Hinweis auf Nebenwirkungen der CIP Applikation. Auch bei diesen Experimenten scheint die Applikation eines CDK5 Inhibitors den Verlauf der EAE positiv zu beeinflussen. Die Schwächen des experimentellen Vorgehens hingegen lagen auch hier bei der mangelnden Fallzahl, so wie dem fehlenden direkten Nachweis des CIP intrathekal, bzw. intrazerebral. Eine Wirkung außerhalb des postulierten CIP p25/CDK5 Signalweges kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Bisher liegen keine vergleichbaren Daten zur i.p. CIP Applikation vor, so dass eine nähere Erforschung der intrathekalen Penetration nach i.p. Gabe in jedem Fall angezeigt erscheint, wenn die Behandlung mit CIP auch in vivo weiter experimentell untersucht werden soll. Noch vielversprechender für

weitere in vivo Experimente scheint ein neueres, nur 24 Aminosäuren großes Peptid (p5) zu sein, das auch in der Lage ist p25/CDK5 spezifisch zu hemmen und in Zellkulturen die Tauphosphorylierung zu vermindern (Zheng et al., 2010). Bei der geringeren Größe ist eine erleichterte Penetration ins ZNS zu erwarten und damit könnte ein größeres therapeutisches Potential einhergehen. Ob in unseren Experimenten die Beeinflussung des p25/CDK5 Signalweges einen Anteil an der Besserung in der EAE hatte, wurde erneut durch Western Blots der besagten Proteine evaluiert.

### **4.7 Untersuchung auf hyperphosphoryliertes Tau und p35/25 nach der i.p. Behandlung mit CIP bei LEW.1N und LEW.1AV1**

Abb. 27 und Abb. 29 zeigt die durchgeführten Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen hyperphosphoryliertes Tau. Zusammengefasst zeigten die Blots auch hier ein sehr kontroverses Ergebnis, das im Weiteren diskutiert werden muss. Bei den LEW.1N Tieren konnte kein Unterschied zwischen der Menge von hyperphosphoryliertem Tau bei der CIP behandelten und der DMSO Kontrollgruppe gezeigt werden. Auch die Menge des p25 wies keinen Unterschied auf. Bei den LEW.1AV1 Tieren zeigte das Ergebnis noch einen weiteren Aspekt. Hier zeigte sich ein Unterschied in der Tau Hyperphosphorylierung mit den Antikörpern AT8 und PHF1, wo es nur bei der DMSO behandelten Gruppe zu einer Hyperphosphorylierung kam, wohingegen die CIP behandelte Gruppe keine Hyperphosphorylierung zeigte. Dies unterstützt unsere bisherige Hypothese und im Vgl. zu den Versuchen mit Roscovitine fiel in diesem Fall die 2. CIP Applikation auch nicht auf das Krankheitsmaximum, sondern in die Phase des Krankheitsanstieges, so dass eine Wirkung auf die Hyperphosphorylierung wie bei den LEW.1N Tieren mit Roscovitine Behandlung gezeigt werden konnte. Im Gegensatz hierzu zeigte sich mit dem Antikörper AT180 ein genau entgegengesetztes Ergebnis mit einer stärkeren Hyperphosphorylierung in der behandelten Gruppe, was die Interpretation erschwert und das Ergebnis relativiert. Die Spaltung von p35 zu p25 war bei der DMSO behandelten Gruppe deutlicher ausgeprägt, ohne aber einen stärkeren Effekt auf die Hyperphosphorylierung zu besitzen. Insgesamt kann der postulierte Mechanismus durch die

durchgeführten Western Blots nur wenig klarer dargestellt werden. Um genaueren Aufschluss über die CDK5 Aktivität und die Calpain abhängige Spaltung zu erhalten, müssen weitere Untersuchungen im Sinne von Aktivitätsnachweisen der CDK5 sowie von Calpain auch in in vivo Experimenten durchgeführt werden. Interessant wären dabei auch neuere gentechnische Ansätze zum Ausschalten der CDK5, wie „gene silencing“ durch RNA-Interaktionen, wie sie bei Modellen der Alzheimer Erkrankung derzeit Teil der Forschung sind (López-Tobón et al., 2011). Zur näheren Beleuchtung des zugrundeliegenden Mechanismus der Verbesserung der EAE durch CIP, sollte in weiteren Experimenten immunhistochemische Nachweise für phosphoryliertes Tau an Hirnschnitten durchgeführt werden. Zusätzlich hierzu müssen auch weitere immunmodulatorische Effekte von CIP in Betracht gezogen werden und die detaillierte Beleuchtung der Immunantwort nach CIP Applikation könnte neue Erkenntnisse über den Mechanismus der klinischen Verbesserung bringen. Ein weiterer sehr interessanter und im Zusammenhang mit Alzheimer und EAE schon beginnend als Therapietarget untersuchter Ansatz wäre Calpain als verantwortliches Enzym für die p35/p25 Spaltung zu modulieren oder zu inhibieren. Mit dem Calpain Inhibitor CYLA konnte eine deutliche Verbesserung des klinischen Verlaufs, eine Reduktion der Demyelinisierung und eine Verminderung des entzündlichen Infiltrats in der MOG induzierten EAE beobachtet werden (Hassen et al., 2008). Zusätzlich hierzu konnte bei einer T-Zell vermittelten EAE, ausgelöst durch den Transfer von MBP (Myelin basisches Protein) spezifischen T-Zellen, das Blockieren von Calpain die Fähigkeit der MBP spezifischen T-Zellen eine EAE auszulösen signifikant reduzieren (Guyton et al., 2009). Aufgrund der weitreichenden Rolle von Calpain, sowohl in der Aktivierung von T-Zellen, Migration der Immunzellen in das ZNS, Spaltung von axonalen und myelinassoziierten Proteinen, sowie neuronaler Apoptose, könnte die Inhibierung von Calpain ein gutes Ziel zur Behandlung der EAE sein, da es in mehrere der postulierten Pathomechanismen eingreift. Weiterhin scheint es in diesem Zusammenhang interessant, dass in Rückenmarkszellen von EAE Ratten deutlich erhöhte Konzentrationen von mRNA für Calpain gefunden und die Menge der detektierten Calpain mRNA und ihre Lokalisation mit der Schwere der Erkrankung korreliert

werden können (Karpenko et al., 2009). Diese Rolle von Calpain wird noch durch die Nutzung anderer Inhibitoren, wie z.B. Calpeptin in der EAE unterstützt. Hier konnte bei LEW. Ratten durch die i.p. Applikation von Calpeptin in einem MBP induzierten EAE Modell eine Besserung des klinischen Verlaufs und eine Reduktion von neuronalem und oligodendroglialem Zelluntergang gezeigt werden. Eine verminderte Expression von proapoptotischen Proteinen, schien hierbei eine causale Rolle zu spielen (Guyton et al., 2010). Einen weiteren Aspekt oder möglichen Fortschritt könnte die Untersuchung von bereits generierten Calpastatin knockout (CAST-KO) und Calpastatin transgenen (CAST-Tg) Mäusen erbringen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass in Hirngewebe von CAST-KO Mäusen die Spaltung von p35 zu p25 deutlich gegenüber dem Wildtyp erhöht war. Passend hierzu zeigten die CAST-Tg Mäuse (mit einer Calpastatin Überexpression) in Hirn Lysaten keine Anzeichen einer p25 Bildung (Sato et al., 2011). Um diese Erkenntnisse auf die EAE zu übertragen wurde in unseren Experimenten deshalb versucht bei C57/Bl6 CAST-Tg und C57/Bl6 CAST-KO Mäusen eine EAE auszulösen. Calpastatin greift hierbei als Inhibitor von Calpain unter anderem in den CDK5 p35/p25 Signalweg ein, was experimentell, wie schon oben erwähnt, von Sato et al. gezeigt werden konnte.

#### **4.8 Induktion einer EAE bei Calpastatin Knockout (CAST-KO), bzw. Calpastatin transgenen (CAST-Tg) Mäusen**

In Abb. 30 wird der Krankheitsverlauf der CAST-Tg und CAST-KO Mäuse gezeigt. Während die C57/Bl6 Kontrollen nach MOG Immunisierung an einer schubförmigen EAE erkrankten, zeigten die CAST-Tg Mäuse keinerlei Erkrankung. Die Überexpression von Calpastatin resultiert hierbei in einer Reduktion der Calpainaktivität und hat möglicherweise analog zu den Ergebnissen von Sato et al. Einfluss auf den p25/CDK5 Signalweg. Andere Mechanismen wie Immunmodulation, direkter Einfluss auf die Aktivität von Lymphozyten, Expression von Apoptoseproteinen oder weitere wenig untersuchte Mechanismen, bei denen Calpain bekanntermaßen eine Rolle spielt, müssen einer genaueren Erforschung unterzogen werden. Die CAST-KO Mäuse zeigten im Vgl. zu den CAST-Tg Mäusen eine deutliche Ausprägung der EAE, im Vgl. zu den Wildtyp

Kontrollen aber einen abgemilderten EAE Verlauf. Der Unterschied zu den Calpain gehemmten Tieren lässt eine klare Rolle des Calpains und damit auch des p25/CDK5 Signalwegs vermuten, dass die Ausprägung aber geringer ausfällt, als bei den Kontrolltieren, muss durch genauere Untersuchungen beleuchtet werden. Eine statistische Aussage über den Krankheitsverlauf kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht getroffen werden, obliegt aber weiteren Untersuchungen mit größeren Fallzahlen. Dennoch unterstützt die mangelnde Induzierbarkeit der EAE bei den CAST-Tg Mäusen die Hypothese eines neurodegenerativen Anteils beim Pathomechanismus der EAE. Um diese Frage abschließend zu erläutern, müssen aber verschiedene weitere Experimente durchgeführt werden, denn obwohl alle Tiere auf einem C57/Bl6 Hintergrund gekreuzt waren, sollte erst an großen Fallzahlen grundlegend die Suszeptibilität der betreffenden transgenen Mäuse für eine EAE gezeigt werden. In Zusammenschau unserer Ergebnisse, aber auch der zahlreichen Arbeiten, die eine Rolle von Calpain sowohl in neurodegenerativen Erkrankungen (Voseler et al., 2008), als auch in der EAE zeigen (Das et al., 2008), scheint Calpain als potentielles Therapieziel für eine Neuroprotektion interessanter Gegenstand weiterer Forschung zu sein.

## 5 Zusammenfassung

Die multiple Sklerose (MS) ist eine inflammatorisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), bei der Läsionen und Entmarkungsherde in der weißen, sowie der grauen Substanz des ZNS auftreten. Neben der Demyelinisierung, ist auch eine Axon- und Neurodegeneration Gegenstand aktueller Forschung, die bei den Patienten mit MS im Verlauf der Erkrankung bleibende neurologische Defizite hervorrufen und für das klinische Bild der MS verantwortlich gemacht werden können.

Obwohl immense Anstrengungen in der Forschung unternommen werden, ist der endgültige Pathomechanismus der Erkrankung weiterhin ungeklärt. Die bisherigen Behandlungsoptionen zielen daher auf die symptomatische Therapie durch eine Modulation des Immunsystems ab.

Die Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) induzierte experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE), dient als Tiermodell der MS und kann einige relevante immunologische und pathogenetische Mechanismen reproduzieren. Eine Überaktivierung der Cyclin abhängigen Kinase 5 (CDK5), hervorgerufen durch eine proteolytische Spaltung des spezifischen Aktivators p35 zum potenteren Spaltprodukt p25, wurde bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer (AD), Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson (PD) und Niemann-Pick Typ C beobachtet. Die fehlregulierte Aktivierung von CDK5 kann zu einer Hyperphosphorylierung des mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau führen, was mit einer Axon- und Neurodegeneration einhergeht.

Auch bei der MOG induzierten EAE konnte erstmals bei kongenen LEW.1N Ratten eine Hyperphosphorylierung des Tau Proteins an pathologischen Stellen und eine vermehrte axonale Pathologie gezeigt werden (Schneider et al., 2004). Hierfür konnte eine vermehrte Spaltung von p35 zu p25 und damit eine Überaktivierung der Proteinkinase CDK5 verantwortlich gemacht werden.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die pharmakologische Verminderung der Tau Hyperphosphorylierung zu einer Reduktion der Axonpathologie und damit zu einer Milderung der klinischen Symptomatik bei der EAE führen kann. Dazu wurde CDK5 durch den chemischen Inhibitor R- Roscovitine oder ein rekombinant hergestelltes p25/CDK5 spezifisches Protein, das CDK5 Inhibitor Protein (CIP) (Zheng et al., 2002), blockiert.

Sowohl mit der i.p. Applikation des chemischen CDK5 Inhibitors R-Roscovitine, als auch mit der Applikation von rekombinant exprimiertem CIP konnte in den MHC kongenen Rattenstämmen LEW.1N und LEW.1AV1 eine Verbesserung der klinischen Symptomatik bei der MOG EAE erreicht werden. Die Untersuchungen zeigten die Hyperphosphorylierung von Tau und eine vermehrte p35/p25 Spaltung und bestätigten damit die Vorbefunde. Allerdings war das Ausmaß der Hyperphosphorylierung bei LEW.1N und LEW.1AV1 Ratten variabel und es sollte deshalb in der Zukunft experimentell geklärt werden, ob neben der p35/p25 CDK5 vermittelten Tau Hyperphosphorylierung, bisher noch unbekannte Signalkaskaden einen Beitrag beim Axon- und Nervenzellenverlust bei der MOG EAE besitzen. Hierzu sind weitere Untersuchungen v.a. der intracerebralen CDK5 und Calpain Aktivität notwendig.

Als ein zusätzliches vielversprechendes Therapietarget konnte Calpain identifiziert werden, das sowohl bei der Immunantwort als auch im p35/p25 CDK5 Signalweg eine bedeutende Rolle spielt. So bewirkte die experimentelle Alteration der Calpainwirkung eine reduzierte Krankheitsschwere bei der MOG EAE.

Die neu gewonnenen Erkenntnisse könnten möglicherweise für neue, innovative therapeutische Ansätze, welche die Calpain - CDK5 abhängige Signalkaskaden bei Patienten mit MS modulieren, genutzt werden und durch eine Parallele zu den neurodegenerativen Erkrankungen könnten wechselseitig Erkenntnisse zur Entwicklung neuroprotektiver Strategien gewonnen werden.

Der Nutzen für eine klinische Anwendung bei der MS oder bei neurodegenerativen Erkrankungen bedarf aber noch weiterer intensiver Forschung.

## 6 Literaturverzeichnis

Ahlijanian MK, Barrezueta NX, Williams RD, Jakowski A, Kowsz KP, McCarthy S, Coskran T, Carlo A, Seymour PA, Burkhardt JE, Nelson RB, McNeish JD. (2000). Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(6):2910-5.

Aktas O, Smorodchenko A, Brocke S, Infante-Duarte C, Schulze Topphoff U, Vogt J, Prozorovski T, Meier S, Osmanova V, Pohl E, Bechmann I, Nitsch R, Zipp F. (2005). Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron.* 46(3):421-32.

Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M. (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.* 22(21):9340-51.

Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(12):5562-6.

Alvarez A, Muñoz JP, Maccioni RB. (2001). A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res.* 2001 Apr 1;264(2):266-74.

Anderson JM, Hampton DW, Patani R, Pryce G, Crowther RA, Reynolds R, Franklin RJ, Giovannoni G, Compston DA, Baker D, Spillantini MG, Chandran S. (2008). Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Brain.* 131(Pt 7):1736-48. Epub 2008 Jun 21.

Angelov DN, Waibel S, Guntinas-Lichius O, Lenzen M, Neiss WF, Tomov TL, Yoles E, Kipnis J, Schori H, Reuter A, Ludolph A, Schwartz M.(2003). Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(8):4790-5. Epub 2003 Mar 31.

Arnon R, Aharoni R. (2004). Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5;101 Suppl 2:14593-8.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 192(3):393-404.

Bandyopadhyay B, Li G, Yin H, Kuret J. (2007). Tau aggregation and toxicity in a cell culture model of tauopathy. *J Biol Chem.* 282(22):16454-64. Epub 2007  
Benner EJ, Mosley RL, Destache CJ, Lewis TB, Jackson-Lewis V, Gorantla S, Nemachek C, Green SR, Przedborski S, Gendelman HE. (2004). Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(25):9435-40. Epub 2004 Jun 14.

Ben-Nun A, Cohen IR. (1981). Vaccination against autoimmune encephalomyelitis (EAE): attenuated autoimmune T lymphocytes confer resistance to induction of active EAE but not to EAE mediated by the intact T lymphocyte line. *Eur J Immunol.* 11(11):949-52.

Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. (1981). Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature.* 292(5818):60-1.

Berberich N, Uhl B, Joore J, Schmerwitz UK, Mayer BA, Reichel CA, Krombach F, Zahler S, Vollmar AM, Fürst R. (2011). Roscovitine blocks leukocyte extravasation by inhibition of cyclin-dependent kinases 5 and 9. *Br J Pharmacol.* doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01309.x. [Epub ahead of print]

Bian F, Nath R, Sobocinski G, Booher RN, Lipinski WJ, Callahan MJ, Pack A, Wang KK, Walker LC. (2002). Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice. *J Comp Neurol.* 446(3):257-66.

Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ, Greengard P. (2001). Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature.* 15;410(6826):376-80.

Bielekova B, Howard T, Packer AN, Richert N, Blevins G, Ohayon J, Waldmann TA, McFarland HF, Martin R. (2009). Effect of anti-CD25 antibody daclizumab in the inhibition of inflammation and stabilization of disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2009 Apr;66(4):483-9.

Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron.* 11(1):153-63.

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 101(4):1371-8.

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain.* 123 ( Pt 6):1174-83.

Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. (2000). Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 48(6):893-901.

Bjartmar C, Kinkel RP, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD. (2001). Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology.* 57(7):1248-52.

Bjartmar C, Trapp BD. (2001). Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol.* 14(3):271-8. Review.

Bjartmar C, Trapp BD. (2003). Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis. *Neurotox Res.* 5(1-2):157-64.

Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD. (2003). Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci.* 206(2):165-71. Review.

Bø L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mørk SJ.(2003). Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler.* 9(4):323-31.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. (1993). Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 10(6):1089-99.

Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain.* 132(Pt 12):3329-41. Epub .

Bu B, Li J, Davies P, Vincent I. (2002). Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *J Neurosci.* 22(15):6515-25.

Butner KA, Kirschner MW. (1991). Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol.* 115(3):717-30.

Cabarrocas J, Bauer J, Piaggio E, Liblau R, Lassmann H. (2003). Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 33(5):1174-82.

Cardone A, Albers RW, Sriram RD, Pant HC. (2010). Evaluation of the interaction of cyclin-dependent kinase 5 with activator p25 and with p25-derived inhibitor CIP. *J Comput Biol.* 17(5):707-21.

Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH. (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron.* 18(1):29-42.

Charcot JM (1868). "Histologie de la sclerose en plaques". *Gazette des hopitaux, Paris* 41: 554–55

Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G, Tiel-Wilck K, de Vera A, Jin J, Stites T, Wu S, Aradhye S, Kappos L; TRANSFORMS Study Group. (2010). Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 362(5):402-15. Epub 2010 Jan 20.

Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK. CAMMS223 Trial Investigators. (2008). Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 359(17):1786-801.

Corradu F, Reyes-Yanez MP, Parra A, Gray J, Smith SI, Taylor CJ, Compston DA. (1998). HLA associations with multiple sclerosis in the Canary Islands. *J Neuroimmunol.* 87(1-2):130-5.

Corradu F, Sawcer S, Feakes R, Chataway J, Broadley S, Jones HB, Clayton D, Gray J, Smith S, Taylor C, Goodfellow PN, Compston A. (1998). HLA typing in the United Kingdom multiple sclerosis genome screen. *Neurogenetics.* 2(1):24-33.

Corcione A, Aloisi F, Serafini B, Capello E, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. (2005). B-cell differentiation in the CNS of patients with multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 4(8):549-54. Review.

Crews L, Patrick C, Adame A, Rockenstein E, Masliah E. (2011). Modulation of aberrant CDK5 signaling rescues impaired neurogenesis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* 2:e120.

Crocker SJ, Smith PD, Jackson-Lewis V, Lamba WR, Hayley SP, Grimm E, Callaghan SM, Slack RS, Melloni E, Przedborski S, Robertson GS, Anisman H, Merali Z, Park DS. (2003). Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 23(10):4081-91.

Cross AH, Trotter JL, Lyons J.(2001). B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol.* 112(1-2):1-14. Review

Cross AH. (2001). Landmark papers in multiple sclerosis. *Neurology.* 57(12 Suppl 5):S1-2

Crowther RA, Wischik CM. (1985). Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament. *EMBO J.* 4(13B):3661-5.

Crowther RA. (1991). Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(6):2288-92.

Das A, Guyton MK, Butler JT, Ray SK, Banik NL. (2008). Activation of calpain and caspase pathways in demyelination and neurodegeneration in animal model of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 7(3):313-20.

Dawson J. (1916). The histology of disseminated sclerosis. *Trans R Soc Edinb.* 50: 517–40

Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ulrich O. (2003). Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med.* 198(11):1729-40.

Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Döring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Dorée M, Mandelkow E. (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* 11(6):2131-8.

Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E. (1995). Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem.* 270(13):7679-88.

Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, Gudz T, Macklin WB, Lewis DA, Fox RJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD. (2006). Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 59(3):478-89.

Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. (2004). Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 3(2):104-10. Review.

Ebers GC. (2008). Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 7(3):268-77. Review.

Fath T, Eidenmüller J, Brandt R. (2002). Tau-mediated cytotoxicity in a pseudo-hyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22(22):9733-41

Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. (1997). Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain.* 120 ( Pt 3):393-9.

Fergusson D, Hutton B, Sharma M, Tinmouth A, Wilson K, Cameron DW, Herbert PC. (2005). Use of intravenous immunoglobulin for treatment of neurologic conditions: a systematic review. *Transfusion.* 45(10):1640-57. Review.

Frenkel D, Maron R, Burt DS, Weiner HL. (2005). Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 115(9):2423-33. Epub 2005 Aug 11.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS. (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 354(9):942-55. Review.

Goedert M, Spillantini MG. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science.* 314(5800):777-81. Review.

Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1994). Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience.* 61(4):765-72.

Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem.* 61(3):921-7.

Gong X, Tang X, Wiedmann M, Wang X, Peng J, Zheng D, Blair LA, Marshall J, Mao Z. (2003). Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron.* 38(1):33-46.

Goodin, DS, Arnason, BG, Coyle, PK, Frohman, EM. (2003). The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 61:1332.

Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, McCauley JL, Sawcer SJ, Compston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Pericak-Vance MA, Haines JL; Multiple Sclerosis Genetics Group. (2007). Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 39(9):1083-91. Epub 2007 Jul 29.

Gupta A, Sanada K, Miyamoto DT, Rovelstad S, Nadarajah B, Pearlman AL, Brunstrom J, Tsai LH. (2003). Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration. *Nat Neurosci.* 6(12):1284-91. Epub 2003 Nov 9.

Guyton MK, Brahmachari S, Das A, Samantaray S, Inoue J, Azuma M, Ray SK, Banik NL. (2009). Inhibition of calpain attenuates encephalitogenicity of MBP-specific T cells. *J Neurochem.* 110(6):1895-907. Epub 2009 Jul 17.

Guyton MK, Wingrave JM, Yallapragada AV, Wilford GG, Sribnick EA, Matzelle DD, Tyor WR, Ray SK, Banik NL. (2005). Upregulation of calpain correlates with increased neurodegeneration in acute experimental auto-immune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 81(1):53-61.

Hafler DA. (2004). Multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 113(6):788-94. Review

Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivins AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome-wide study. *N Engl J Med.* 357(9):851-62. Epub 2007 Jul 29.

Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett.* 147(1):58-62.

Hassen GW, Feliberti J, Kesner L, Stracher A, Mokhtarian F. (2006). A novel calpain inhibitor for the treatment of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 180(1-2):135-46. Epub 2006 Sep 26.

Hassen GW, Feliberti J, Kesner L, Stracher A, Mokhtarian F. (2008). Prevention of axonal injury using calpain inhibitor in chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1236:206-15. Epub 2008 Aug 12.

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH; HERMES Trial Group. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 358(7):676-88.

Hellmich MR, Pant HC, Wada E, Battey JF. (1992). Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(22):10867-71.

Hillert J, Olerup O. (1993). Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,Dw2 haplotype. *Neurology.* 43(1):163-8.

Hobom M, Storch MK, Weissert R, Maier K, Radhakrishnan A, Kramer B, Bähr M, Diem R. (2004). Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Pathol.* 14(2):148-57.

Hohlfeld R, Wekerle H. (2001). Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 299-304. Review.

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med.* 194(5):669-76.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). (2009). The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes. *Genes Immun.* 10(1):11-4. Epub 2008 Nov 6.

Jersild C, Dupont B, Fog T, Hansen GS, Nielsen LS, Thomsen M, Svejgaard A. (1973). Histocompatibility-linked immune-response determinants in multiple sclerosis. *Transplant Proc.* 5(4):1791-6.

Jersild C, Fog T, Hansen GS, Thomsen M, Svejgaard A, Dupont B. (1973). Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet* 2:1221-1225.

Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P. (1999). cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 19(17):7486-94.

Johnson GV, Bailey CD. (2002). Tau, where are we now? *J Alzheimers Dis.* 4(5):375-98. Review.

Johnson GV, Hartigan JA. (1999). Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update. *J Alzheimers Dis.* 1(4-5):329-51.

Johnson GV, Stoothoff WH. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci.* 117(Pt 24):5721-9. Review.

Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB. (1995). Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 45(7):1268-76.

Kabat EA, Wolf A, Bezere AE, Murray JP. (1951). Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med.* 93(6):615-33

Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P; FREEDOMS Study Group. (2010). A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 362(5):387-401. Epub 2010 Jan 20.

Karpenko MN, Abdurasulova IN, Klimenko VM. (2011). Calpain Activity in Spinal Cord Cells from Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis of Different Grades. *Neurosci Behav Physiol.* 2011 Feb 12. [Epub ahead of print]

Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 66(3):390-402.

Keegan BM and Noseworthy JH. (2002). Multiple sclerosis. *Annu Rev Med.* 53:285-302

Kenessey A, Yen SH. (1993). The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res.* 26;629(1):40-6.

Kidd M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197:192-3.

Koritschoner, R.S., Schweinburg, F. (1925). Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z. Immunitätsf. Exp. Therapie* 42:217-283.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 27:485-517. Review.

Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. (2007). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 13(4):423-31. Epub 2007 Mar 25.

Kornek B, Lassmann H. (1999). Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note. *Brain Pathol.* 9(4):651-6.

Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H. (2000). Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol.* 157(1):267-76

Ksiezak-Reding H, Tracz E, Yang LS, Dickson DW, Simon M, Wall JS. (1996). Ultrastructural instability of paired helical filaments from corticobasal degeneration as examined by scanning transmission electron microscopy. *Am J Pathol.* 149(2):639-51.

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. (2005). Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 128(Pt 11):2705-12. Epub 2005 Oct 17.

Kwon OJ, Karni A, Israel S, Brautbar C, Amar A, Meiner Z, Abramsky O, Karussis D. (1999). HLA class II susceptibility to multiple sclerosis among Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews. *Arch Neurol*. 56(5):555-60.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.

Lee G, Neve RL, Kosik KS. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*. 2(6):1615-24.

Lee KY, Clark AW, Rosales JL, Chapman K, Fung T, Johnston RN. (1999). Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci Res*. 34(1):21-9.

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*. 405(6784):360-4.

Lee MS, Tsai LH. (2003) Cdk5: one of the links between senile plaques and neurofibrillary tangles? *J Alzheimers Dis*. 5(2):127-37. Review.

Lew J, Beaudette K, Litwin CM, Wang JH. (1992). Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain. *J Biol Chem*. 267(19):13383-90.

Lew J, Huang QQ, Qi Z, Winkfein RJ, Aebersold R, Hunt T, Wang JH. (1994). A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*. 371(6496):423-6.

Li BS, Ma W, Jaffe H, Zheng Y, Takahashi S, Zhang L, Kulkarni AB, Pant HC. (2003). Cyclin-dependent kinase-5 is involved in neuregulin-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity mediating neuronal survival. *J Biol Chem*. 278(37):35702-9. Epub 2003 Jun 24.

Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC. (2001). Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(22):12742-7. Epub 2001 Oct 2.

Lindwall G, Cole RD. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*. 259(8):5301-5.

Lindwall G, Cole RD. (1984). The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J Biol Chem*. 259(19):12241-5.

Lopes JP, Agostinho P. (2011). Cdk5: Multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol.* 2011 Apr 5;94(1):49-63. [Epub ahead of print]

López-Tobón A, Castro-Álvarez JF, Piedrahita D, Boudreau RL, Gallego-Gómez JC, Cardona-Gómez GP. (2011). Silencing of CDK5 as potential therapy for Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 2011;22(2):143-52.

Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, Racke MK. (1998). Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J Clin Invest.*101(4):725-30.

Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E. (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging.* 24(8):1079-85.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121.

Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. (2001). Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol.* 159(3):809-15.

Menn B, Bach S, Blevins TL, Campbell M, Meijer L, Timsit S. (2010). Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models. *PLoS One.* 5(8):e12117.

Meyer R, Weissert R, Diem R, Storch MK, de Graaf KL, Kramer B, Bahr M. (2001). Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J Neurosci.* 21(16):6214-20.

Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.*11(8):2909-17.

Migheli A, Butler M, Brown K, Shelanski ML. (1988). Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. *J Neurosci.* 8(6):1846-51.

Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, Willmer-Hulme AJ, Dalton CM, Miszkiel KA, O'Connor PW; International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group. (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.*348(1):15-23.

Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, Hunt S, Morrison J, Whitaker P, Lander ES, Cardon LR, Bentley DR, Rioux JD, Beck S, Deloukas P. (2005). A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 6(4):634-46. Epub 2005 Mar 1.

Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Guo W, Garden GA. (2003). p53-dependent cell death signaling in neurons. *Neurochem Res.* 28(1):15-27. Review.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136(7):2348-57.

Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. (2009). Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol.* 9(4):246-58. Review.

Nguyen MD, Larivière RC, Julien JP. (2001). Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron.* 30(1):135-47.

Nitsch R, Pohl EE, Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F. (2004). Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *J Neurosci.* 24(10):2458-64.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 343(13):938-52. Review.

Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(20):11173-8.

Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. (2008). The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet.* 9(7):516-26. Epub 2008 Jun 10. Review.

Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, Lincoln RR, Swerdlin A, Mignot E, Lin L, Goodin D, Erlich HA, Schmidt S, Thomson G, Reich DE, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL. (2004). Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet.* 74(1):160-7. Epub 2003 Dec 10.

Oksenberg JR, Barcellos LF. (2005). Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes Immun.* 6(5):375-87. Review.

Olerup O, Hillert J. (1991). HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens*. 38(1):1-15.

Papasozomenos SC, Binder LI. (1987). Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton*. 8(3):210-26.

Pareek TK, Lam E, Zheng X, Askew D, Kulkarni AB, Chance MR, Huang AY, Cooke KR, Letterio JJ. (2010). Cyclin-dependent kinase 5 activity is required for T cell activation and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 207(11):2507-19. Epub 2010 Oct 11.

Patrick C, Crews L, Desplats P, Dumaop W, Rockenstein E, Achim CL, Everall IP, Masliah E. (2011). Increased CDK5 Expression in HIV Encephalitis Contributes to Neurodegeneration via Tau Phosphorylation and Is Reversed with Roscovitine. *Am J Pathol*. 178(4):1646-61.

Patrick GN, Zhou P, Kwon YT, Howley PM, Tsai LH. (1998). p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 273(37):24057-64.

Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 402(6762):615-22.

Patzke H, Tsai LH. (2002). Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *J Biol Chem*. 277(10):8054-60. Epub 2002 Jan 9.

Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH. (1993). Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem*. 268(31):23512-8.

Paxinos G, Watson C. (1998) *The Rat Brain in stereotaxic Coordinates*, Fourth Edition, George Paxinos & Charles Watson, Academic Press 1998

Peterson DW, Ando DM, Taketa DA, Zhou H, Dahlquist FW, Lew J. (2010). No difference in kinetics of tau or histone phosphorylation by CDK5/p25 versus CDK5/p35 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(7):2884-9. Epub 2010 Feb 1.

Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD. (2001). Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 2001. 50(3):389-400.

Pierre M, Nunez J. (1983). Multisite phosphorylation of tau proteins from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 115(1):212-9.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 69(2):292-302.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 58(6):840-6. Review

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. (1993). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol.* 13(3):227-31.

Quan Q, Liu X, He Y, Jin L, Zhao L. (2010). Effect of cdk5 antagonist on L-dopa-induced dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Neurosci.* 120(6):421-7.

Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. (2005). Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology.* 64(8):1336-42. Review.

Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. (1933). Observations on attempts to produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med.* 58(1):39-53.

Rosche B, Kieseier B, Hartung HP, Hemmer B. (2003). New understanding of the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nervenarzt.* 74(8):654-63. Review. German

Sadovnick AD and Baird PA. (1988). The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology.* 38(6):990-1.

Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ, et al. (1993). A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol.* 33(3):281-5.

Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH. (1988). Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet.* 29:533-41

Sadovnick AD. (1993). Familial recurrence risks and inheritance of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 6(2):189-94. Review.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839):487-91.

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230(4732):1350-4.
- Saito T, Onuki R, Fujita Y, Kusakawa G, Ishiguro K, Bibb JA, Kishimoto T, Hisanaga S. (2003). Developmental regulation of the proteolysis of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator by phosphorylation. *J Neurosci*. 23(4):1189-97.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(12):5463-7.
- Sato K, Minegishi S, Takano J, Plattner F, Saito T, Asada A, Kawahara H, Iwata N, Saido TC, Hisanaga S. (2011). Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25. *J Neurochem*. 117(3):504-15. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07222.x. Epub 2011 Mar 15.
- Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. (2007). HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 15;165(10):1097-109. Epub 2007 Feb 28.
- Schneider A, Araújo GW, Trajkovic K, Herrmann MM, Merkler D, Mandelkow EM, Weissert R, Simons M. (2004). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem*. 279(53):55833-9. Epub 2004 Oct 19.
- Schumacher, GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, Nagler B, Sibley WA, Tourtelotte WW, Wilmont TL (1965). Problems of experimental trials of therapy in Multiple Sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 31;122:552-68.
- Shields DC, Schaecher KE, Saido TC, Banik NL. (1999). A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(20):11486-91.
- Shriver LP, Dittel BN. (2006). T-cell-mediated disruption of the neuronal microtubule network: correlation with early reversible axonal dysfunction in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 169(3):999-1011
- Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R, Goebels N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(8):2428-33.
- Smith PD, Mount MP, Shree R, Callaghan S, Slack RS, Anisman H, Vincent I, Wang X, Mao Z, Park DS. (2006). Calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in dopaminergic neuron death through modulation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci*. 26(2):440-7.

Sorensen PS, Haas J, Sellebjerg F, Olsson T, Ravnborg M; TARIMS Study Group. (2004). IV immunoglobulins as add-on treatment to methylprednisolone for acute relapses in MS. *Neurology*. 14;63(11):2028-33.

Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Söling HD, Drechsel D, Kirschner MW, et al. (1990). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J*. 9(11):3539-44.

Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science*. 307(5713):1282-8.

Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med*. 14(3):337-42. Epub 2008 Feb 17.

Tang D, Yeung J, Lee KY, Matsushita M, Matsui H, Tomizawa K, Hatase O, Wang JH. (1995). An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J Biol Chem*. 270(45):26897-903.

Tarricone C, Dhavan R, Peng J, Areces LB, Tsai LH, Musacchio A. (2001). Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex. *Mol Cell*. 8(3):657-69.

Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. (2006). Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*. 59(3):499-503. Review.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4.

Town T, Zolton J, Shaffner R, Schnell B, Crescentini R, Wu Y, Zeng J, DelleDonne A, Obregon D, Tan J, Mullan M. (2002). p35/Cdk5 pathway mediates soluble amyloid-beta peptide-induced tau phosphorylation in vitro. *J Neurosci Res*. 69(3):362-72.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 338(5):278-85.

Tsai LH, Takahashi T, Caviness VS Jr, Harlow E. (1993). Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development*. 119(4):1029-40.

Tsaknaridis L, Spencer L, Culbertson N, Hicks K, LaTocha D, Chou YK, Whitham RH, Bakke A, Jones RE, Offner H, Bourdette DN, Vandenbark AA. (2003). Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res.* 74(2):296-308.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 172(1):146-55. Epub 2007 Dec 21.

Uchida T, Ishiguro K, Ohnuma J, Takamatsu M, Yonekura S, Imahori K. (1994). Precursor of cdk5 activator, the 23 kDa subunit of tau protein kinase II: its sequence and developmental change in brain. *FEBS Lett.* 355(1):35-40.

Vale RD, Malik F, Brown D. (1992). Directional instability of microtubule transport in the presence of kinesin and dynein, two opposite polarity motor proteins. *J Cell Biol.* 119(6):1589-96.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 199(7):971-9.

Vosler PS, Brennan CS, Chen J. (2008). Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 38(1):78-100.

Waldor MK, Sriram S, Hardy R, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Lanier L, Lim M, Steinman L. (1985). Reversal of experimental allergic encephalomyelitis with monoclonal antibody to a T-cell subset marker. *Science.* 227(4685):415-7.

Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1995). Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem.* 270(9):4854-60.

Weishaupt JH, Kussmaul L, Grötsch P, Heckel A, Rohde G, Romig H, Bähr M, Gillardon F. (2003). Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Neurosci.* 24(2):489-502.

Weishaupt JH, Neusch C, Bähr M. (2003). Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res.* 312(1):1-8. Epub 2003 Mar 26. Review.

Weissert R, Wallström E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, Linington C, Olsson T. (1998). MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest.* 102(6):1265-73.

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. (1994). Animal models. *Ann Neurol.* 36 Suppl:S47-53.

Wekerle H.(1992).Myelin specific, autoaggressive T cell clones in the normal immune repertoire: their nature and their regulation. *Int Rev Immunol.* 231-41. Review.

Wucherpfennig KW, Strominger JL. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* 80(5):695-705.

Yoshida H, Ihara Y. (1993). Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau. *J Neurochem.* 61(3):1183-6.

Zamvil SS, Steinman L. (1990). The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol.*8:579-621. Review

Zhang J, Krishnamurthy PK, Johnson GV. (2002). Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity. *J Neurochem.* 81(2):307-13.

Zhang M, Li J, Chakrabarty P, Bu B, Vincent I. (2004). Cyclin-dependent kinase inhibitors attenuate protein hyperphosphorylation, cytoskeletal lesion formation, and motor defects in Niemann-Pick Type C mice. *Am J Pathol.* 165(3):843-53.

Zheng YL, Amin ND, Hu YF, Rudrabhatla P, Shukla V, Kanungo J, Kesavapany S, Grant P, Albers W, Pant HC. (2010). A 24-residue peptide (p5), derived from p35, the Cdk5 neuronal activator, specifically inhibits Cdk5-p25 hyperactivity and tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem.* 285(44):34202-12. Epub 2010 Aug 18.

Zheng YL, Kesavapany S, Gravell M, Hamilton RS, Schubert M, Amin N, Albers W, Grant P, Pant HC. (2005). A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons. *EMBO J.* 24(1):209-20. Epub 2004 Dec 9.

Zheng YL, Li BS, Amin ND, Albers W, Pant HC. (2002). A peptide derived from cyclin-dependent kinase activator (p35) specifically inhibits Cdk5 activity and phosphorylation of tau protein in transfected cells. *Eur J Biochem.* 269(18):4427-34.

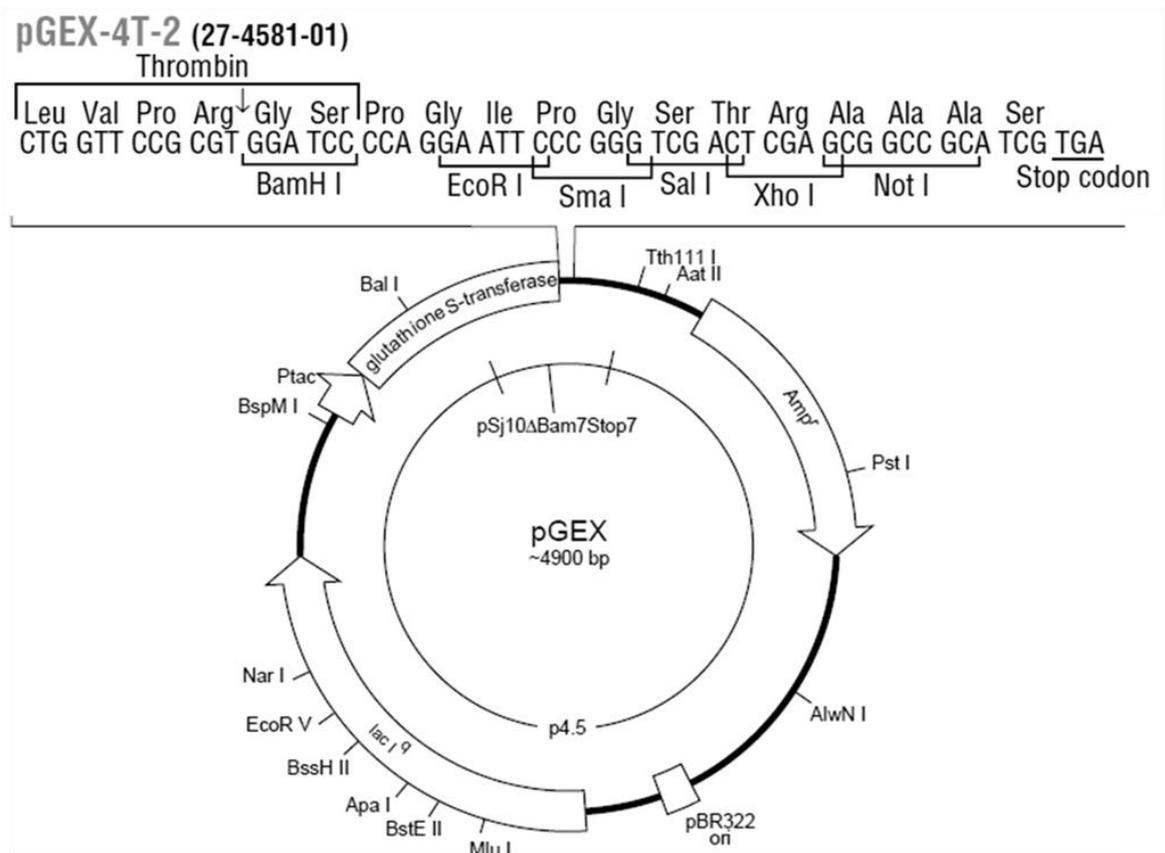
Zhou J, Wang H, Feng Y, Chen J. (2010). Increased expression of cdk5/p25 in N2a cells leads to hyperphosphorylation and impaired axonal transport of neurofilament proteins. *Life Sci.* 86(13-14):532-7. Epub 2010 Feb 12.

Ziemssen T, Ziemssen F. (2005). The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Autoimmun Rev.* 4(7):460-7. Review

Ziemssen T. (2005). Modulating processes within the central nervous system is central to therapeutic control of multiple sclerosis. *J Neurol.* 252 Suppl 5:v38-45.

## 7 Anhang

### 7.1 Vektorkarte des pGEX-4T2 Vektors



**Abb. 31:** pGEX-4T-2 Vektor (Amersham Biosciences / GE healthcare)

#### 7.1.1 Sequenz des pGEX-4T2 Vektors

```

1 ACGTTATCGA CTGCACGGTG CACCAATGCT TCTGGCGTCA GGCAGCCATC GGAAGCTGTG
61 GTATGGCTGT GCAGGTCGTA AATCACTGCA TAATTCGTGT CGCTCAAGGC GCACTCCCCT
121 TCTGGATAAT GTTTTTGCG CCGACATCAT AACGGTCTG GCAAATATTC TGAAATGAGC
181 TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT ACAAATTTCA
241 CACAGGAAAC AGTATTCATG TCCCCTATAC TAGGTTATTG GAAAATTAAG GGCCTTGTC
301 AACCCACTCG ACTTCTTTTG GAATATCTTG AAGAAAATA TGAAGAGCAT TTGTATGAGC
361 GCGATGAAGG TGATAAATGG CGAAACAAA AGTTTGAATT GGGTTTGGAG TTTCCCAATC
421 TTCCTTATTA TATTGATGGT GATGTTAAAT TAACACAGTC TATGGCCATC ATACGTTATA
481 TAGCTGACAA GCACAACATG TTGGGTGGTT GTCCAAAAGA GCGTGCAGAG ATTTCAATGC
541 TTGAAGGAGC GGTTTTGGAT ATTAGATACG GTGTTTCGAG AATTGCATAT AGTAAAGACT
601 TTGAAACTCT CAAAGTTGAT TTTCTTAGCA AGCTACCTGA AATGCTGAAA ATGTTTCGAAG
661 ATCGTTTATG TCATAAAACA TATTTAAATG GTGATCATGT AACCCATCCT GACTTCATGT
  
```

721 TGTATGACGC TCTTGATGTT GTTTTATACA TGGACCCAAT GTGCCTGGAT GCGTTCCCAA  
781 AATTAGTTTG TTTTAAAAA CGTATTGAAG CTATCCACA AATTGATAAG TACTTGAAAT  
841 CCAGCAAGTA TATAGCATGG CCTTTGCAGG GCTGGCAAGC CACGTTTGGT GGTGGCGACC  
901 ATCTCCAAA ATCGGATCTG GTTCCGCGTG GATCCCCAGG AATCCCGGG TCGACTCGAG  
961 CGGCCGCATC GTGACTGACT GACGATCTGC CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGTGAAAAAC  
1021 CTCTGACACA TGCAGTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC  
1081 AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC AGCCATGACC  
1141 CAGTCACGTA GCGATAGCGG AGTGATAAT TCTTGAAGAC GAAAGGGCCT CGTGATACGC  
1201 CTATTTTTAT AGGTTAATGT CATGATAATA ATGGTTTCTT AGACGTCAGG TGGCACTTTT  
1261 CGGGGAAATG TGCGCGGAAC CCCTATTTGT TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT  
1321 CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG CTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG  
1381 AGTATTCAAC ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCTGTT  
1441 TTTGCTCACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT GGTGACGCA  
1501 GTGGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA  
1561 GAACGTTTTT CAATGATGAG CACTTTTAAA GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT  
1621 GTTGACGCCG GGCAAGAGCA ACTCGGTCGC CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTTGTTT  
1681 GAGTACTCAC CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC  
1741 AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAAACT GCGGCCAACT TACTTCTGAC AACGATCGGA  
1801 GGACCGAAGG AGCTAACCGC TTTTTGCAC AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT  
1861 CGTTGGGAAC CGGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAACGACG AGCGTGACAC CAGATGCCT  
1921 GCAGCAATGG CAACAACGTT GCGCAAATA TTAAGTGGCG AACTACTTAC TCTAGCTTCC  
1981 CGGCAACAAT TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGCGCTCG  
2041 GCCCTCCCG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG CCGGTGAGCG TGGTCTCGC  
2101 GGTATCATTG CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG  
2161 ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA  
2221 CTGATTAAGC ATTGGAATCT GTCAGACCAA GTTTACTCAT ATATACTTA GATTGATTA  
2281 AAATTCATT TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTGTATA TCTCATGACC  
2341 AAAATCCCTT AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCCGTAGA AAAGATCAAA  
2401 GGATCTTCTT GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC AAAAAACCA  
2461 CCGTACCAG CGGTGGTTTG TTTGCCGAT CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA  
2521 ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTCCTTC TAGTGAGCC GTAGTTAGGC  
2581 CACCACTTCA AGAACTCTGT AGCACCGCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA  
2641 GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG ACGATAGTTA  
2701 CCGGATAAGG CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTCGT GCACACAGCC CAGCTTGGAG  
2761 CGAACGACCT ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC TATGAGAAAG CGCCACGCTT  
2821 CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC  
2881 ACGAGGGAGC TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA GTCCTGTCCG GTTTCGCCAC  
2941 CTCTGACTTG AGCGTCGATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG GCGGAGCCT ATGAAAAAC  
3001 GCCAGCAACG CGGCCTTTT ACGGTTCTG GCCTTTTGT GGCCTTTTGC TCACATGTT  
3061 TTTCTGCGT TATCCCCTGA TTCTGTGGAT AACCGTATTA CCGCCTTTGA GTGAGCTGAT  
3121 ACCGCTCGCC GCAGCCGAAC GACCGAGCGC AGCGAGTCAG TGAGCGAGGA AGCGGAAGAG  
3181 CGCCTGATGC GGTATTTTCT CTTACGCAT CTGTGCGGTA TTTACACCG CATAAATTCC  
3241 GACACCATCG AATGGTGCAA AACCTTTCGC GGTATGGCAT GATAGCGCCC GGAAGAGAGT  
3301 CAATTCAGGG TGGTGAATGT GAAACCAGTA ACGTTATACG ATGTCGCAGA GTATGCCGGT  
3361 GTCTCTTATC AGACCGTTTC CCGCGTGGTG AACCAGGCCA GCCACGTTTC TGCGAAAACG  
3421 CGGGAAAAAG TGAAGCGGC GATGGCGGAG CTGAATTACA TTCCAACCG CGTGGCACAA  
3481 CAACTGGCGG GCAAACAGTC GTTGTGATT GCGGTTGCCA CCTCCAGTCT GGCCCTGCAC  
3541 GCGCCGTCGC AAATTGTCGC GCGGATTTAA TCTCGCGCCG ATCAACTGGG TGCCAGCGTG  
3601 GTGGTGTCTGA TGGTAGAACG AAGCGGCGTC GAAGCCTGTA AAGCGGCGGT GCACAATCTT  
3661 CTCGCGCAAC GCGTCAGTGG GCTGATCATT AACTATCCCG TGGATGACCA GGATGCCATT

3721 GCTGTGGAAG CTGCCTGCAC TAATGTTCCG GCGTTATTC TTGATGTCTC TGACCAGACA  
 3781 CCCATCAACA GTATTATTTT CTCCCATGAA GACGGTACGC GACTGGGCGT GGAGCATCTG  
 3841 GTCGCATTGG GTCACCAGCA AATCGCGCTG TTAGCGGGCC CATTAAAGTTC TGTCTCGGCG  
 3901 CGTCTGCGTC TGGCTGGCTG GCATAAATAT CTCACTCGCA ATCAAATTCA GCCGATAGCG  
 3961 GAACGGGAAG GCGACTGGAG TGCCATGTCC GGTTTTCAAC AAACCATGCA AATGCTGAAT  
 4021 GAGGGCATCG TTCCCACTGC GATGCTGGTT GCCAACGATC AGATGGCGCT GGGCGCAATG  
 4081 CGCGCCATTA CCGAGTCCGG GCTGCGCGTT GGTGCGGATA TCTCGGTAGT GGGATACGAC  
 4141 GATACCGAAG ACAGCTCATG TTATATCCCG CCGTTAACCA CCATCAAACA GGATTTTCGC  
 4201 CTGCTGGGGC AAACCAGCGT GGACCGCTTG CTGCAACTCT CTCAGGGCCA GGCGGTGAAG  
 4261 GGCAATCAGC TGTTGCCCGT CTCACTGGTG AAAAGAAAAA CCACCCTGGC GCCCAATACG  
 4321 CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGCCGAT TCATTAATGC AGCTGGCACG ACAGGTTTCC  
 4381 CGACTGAAA GCGGGCAGTG AGCGCAACGC AATTAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC  
 4441 ACCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCCGGC TCGTATGTTG TGTGGAATTG TGAGCGGATA  
 4501 ACAATTTAC ACAGGAAACA GCTATGACCA TGATTACGGA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC  
 4561 AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTA TCGCCTTGCA GCACATCCCC  
 4621 CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC  
 4681 GCAGCCTGAA TGGCGAATGG CGCTTTCCT GGTTCCTGGC ACCAGAAGCG GTGCCGAAAA  
 4741 GCTGGCTGGA GTGCGATCTT CCTGAGCCG ATACTGTCGT CGTCCCCTCA AACTGGCAGA  
 4801 TGCACGGTTA CGATGCGCCC ATCTACACCA ACGTAACCTA TCCCATTACG GTCATCCGC  
 4861 CGTTTGTCC CACGGAGAAT CCGACGGGT GTTACTCGCT CACATTTAAT GTTGATGAAA  
 4921 GCTGGCTACA GGAAGGCCAG ACGCGAATTA TTTTGTATGG CGTTGGAATT

## 7.2 Vektorkarte des pcDNA 3.1/ HIS C Vektors

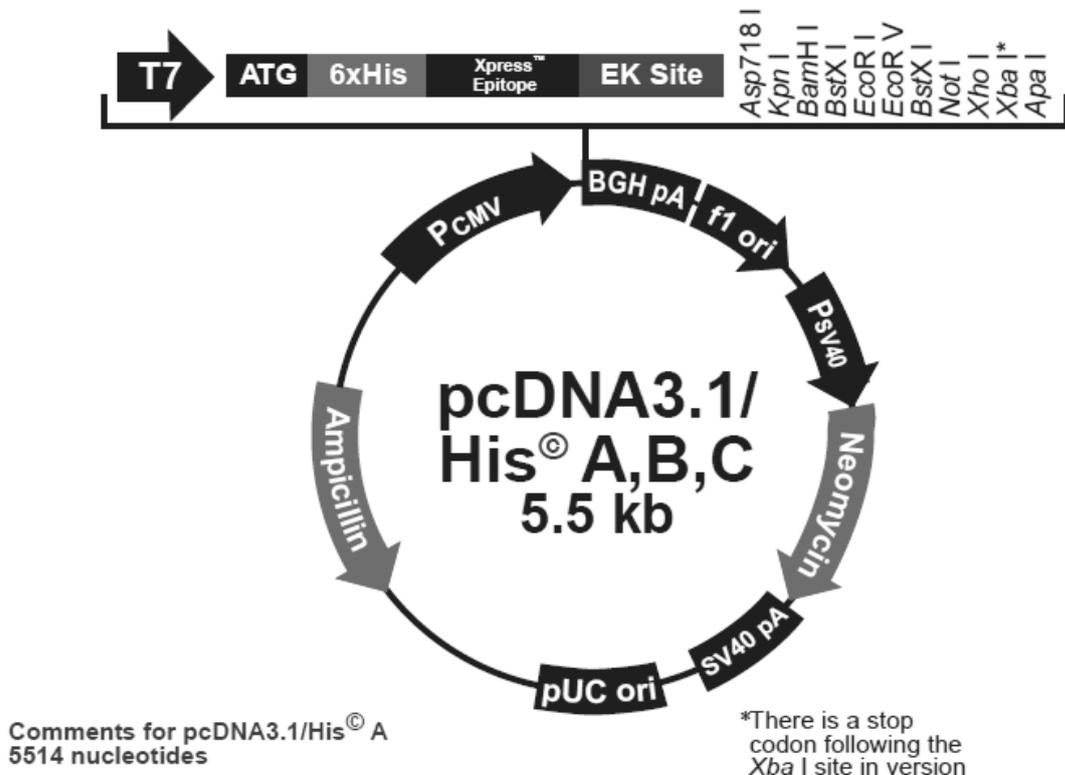


Abb. 32: pcDNA 3.1/HIS C Vektor (Invitrogen)

### 7.2.1 Sequenz des pcDNA 3.1/ HIS C Vektors

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGT  
TAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTA  
CAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTC  
GCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG  
GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCT  
GACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA  
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC  
ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACA  
TGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCG  
GTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT  
TGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACCTCCGC  
CCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAA  
CTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCT  
AGCGTTTAAACTTAAGCTTACCATGGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACT  
GGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGTGG  
AATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCA  
GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTCCTTCTTACCCCTGGA  
AGGTGCCACTCCCCTGCTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT  
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAT  
GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATC  
CCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACA  
CTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCC  
CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCAAA  
AACTTGATTAGGGTGTGTTTACGTAAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACG  
TTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT  
ATTCTTTTGAATTAAGGGATTTGCCGATTTCCGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAA  
ATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCA  
GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCC  
AGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCC  
CATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATG  
CAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTA  
GGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTTGTATATCCATTTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGG  
ATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTAT  
TCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAG  
GGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGC  
GCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTCACTGAAGCGG  
GAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGTCTCTGCC  
GAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTATCCGGCTACCTGCCATT  
GACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGA  
TGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATG  
CCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCTGAATATCATGGTGGAAAATGG  
CCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGG  
CTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCG  
CCGCTCCCATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGG  
GTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTA  
TGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCA

TGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCAT  
CACAAATTTACAAATAAAGCATTTCCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT  
CTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT  
GTGAAATTGTTATCCGCTACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG  
GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACC  
TGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCT  
TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA  
AAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCC  
AGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGAC  
GAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG  
CGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGC  
CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTC  
GTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAAC  
TATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT  
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG  
AAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG  
ATCCGGCAAACAACCCAGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA  
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCAC  
GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAA  
GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC  
ACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG  
ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCC  
AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCG  
CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACA  
ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGG  
TTCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCC  
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTC  
TCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA  
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAG  
AACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTT  
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTT  
CTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAAGGGAATAAGGGCGCACAGGAAATGTT  
GAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAC  
ATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCT  
GACGTC

### 7.3 CIP AS-Sequenz

CLGEFLC RRCYRLKHL S PTDPVLWLR S VDRSLLQGW QDQGFITPAN  
VFLYMLCRD VISSEVGS DH ELQAVLLTCL YLSYSYMGNE ISYPLKPFV  
ESCKKEAFWDR CLSVINLMSS KMLQINADF

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Pathogenese der MS
- Abb.2: Hypothese über die Wirkungsweise von CDK5/p25 Komplex und Tauphosphorylierung bei der EAE
- Abb.3: Hypothese der Wirkungsweise möglicher Versuchs- und Behandlungsansätze
- Abb.4: Auffinden des linken Seitenventrikels zur stereotaktischen Operation
- Abb.5 - 7: Operatives Setting
- Abb.8: Krankheitsverlauf nach Induktion einer EAE bei LEW.1N Rattenstämmen
- Abb.9: Krankheitsverlauf nach Induktion einer EAE bei LEW.1AV1 Rattenstämmen
- Abb.10: Western Blot bei LEW.1N Ratten zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau Protein
- Abb.11: Western Blot bei LEW.1AV1 Ratten zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau Protein
- Abb.12: Krankheitsverlauf nach prophylaktischer i.p. Applikation von R-Roscovitine bei LEW.1N
- Abb.13: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.p. Applikation von R-Roscovitine bei LEW.1N
- Abb.14: Western Blot bei LEW.1N nach der MOG Immunisierung und therapeutischer intraperitonealer R-Roscovitine Applikation
- Abb.15: H.E. Färbung mit Nachweis des Stichkanals der i.t. Injektion
- Abb.16: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.t. Applikation von R-Roscovitine bei LEW.1N
- Abb.17: Vgl. der Mittelwerte des Krankheitsscores nach R-Roscovitine i.t.
- Abb.18: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.p. Applikation von R-Roscovitine bei LEW.1AV1
- Abb.19: INF- $\gamma$  ELISPOT nach Stimulation von Milzzellen
- Abb.20: Western Blot bei LEW.1AV1 nach der MOG Immunisierung und therapeutischer intraperitonealer R-Roscovitine Applikation
- Abb.21: Agarose Gelelektrophorese (2% Agarose) von CIP - pcDNA 3.1/ HIS C Plasmid
- Abb.22: Agarose Gelelektrophorese (2% Agarose) von CIP - pGEX-4T2 Plasmid
- Abb.23: Sequenzierung des- pGEX-4T2 Plasmids nach Amplifikation
- Abb.24: Gelelektrophorese von CIP Induktion und Expression durch verschiedene Einwirkungszeit von IPTG bei CIP pGEX-4T2 Plasmid transformierten E. coli Bakterien
- Abb.25: Säulenreinigung und Eluierung von CIP
- Abb.26: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.p. Applikation von CIP bei LEW.1N

- Abb.27: Western Blot bei LEW.1N nach der MOG Immunisierung und therapeutischer intraperitonealer CIP Applikation
- Abb.28: Krankheitsverlauf nach therapeutischer i.p. Applikation von CIP bei LEW.1AV1
- Abb.29: Western Blot bei LEW.1AV1 nach der MOG Immunisierung und therapeutischer intraperitonealer CIP Applikation
- Abb.30: Krankheitsverlauf nach MOG<sub>35-55</sub> Immunisierung bei C57/Bl6, C57/Bl6 CAST-KO und C57/Bl6 CAST-Tg Mäusen
- Abb.31: pGEX-4T-2 Vektor (Amersham Biosciences / GE healthcare)
- Abb.32: pcDNA 3.1/HIS C Vektor (Invitrogen)

## 8 Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Robert Weissert für die Idee und Konzeption der Arbeit, sowie die Betreuung und oft notwendige wissenschaftliche Diskussion. Von ebenso großer Bedeutung für den Beginn und das Gelingen der Arbeit war Frau Dr. Katrien L. deGraaf, die mir das wissenschaftliche „know-how“ vermittelt hat und mir bei Problemen und der technischen Umsetzung von Ideen zur Seite stand.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der ehemaligen AG Weissert bedanken, die mich während meiner Labortätigkeit sowohl durch praktische Hilfen, als auch durch wissenschaftliche Diskussionen, v.a. aber durch den freundlichen Umgang, immer positiv bestärkt und unterstützt haben.

Auch möchte ich mich in besonderer Weise bei den Wissenschaftlern bedanken, die uns benötigte Materialien zur Verfügung gestellt haben, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Hierzu gehören die CIP-Plasmide, die von Dr. Niranja Amin und Dr. Yali Zheng aus dem Labor von Dr. Harish C. Pant hergestellt und bereitgestellt wurden. Verschiedene Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau wurden freundlicherweise von Prof. Peter Davies und seiner Arbeitsgruppe bereitgestellt. Die knockout und transgenen Mäuse wurden durch Dr. Nobuhisa Iwata aus dem Labor von Prof. Takaomi C. Saido hergestellt und ich bedanke mich für die Erlaubnis sie in meinen Experimenten mit einbeziehen zu dürfen.

Diese Dissertation wurde finanziell und durch Sachmittel vom IZKF Promotionskolleg Tübingen unterstützt. Hierfür gebührt dem Promotionskolleg großer Dank, da mir ermöglichte wurde, in den gemeinsamen Veranstaltungen einen kritischen Blick auf wissenschaftliches Arbeiten und die genutzte Methodik zu gewinnen. Die Diskussionen, die Vorträge, aber auch die notwendige Präsentation von Ergebnissen, eröffnete mir einen Blick für das Wesentliche bei der wissenschaftlichen Arbeit und der universitären Forschung.

Meiner Freundin Anna will ich danken, dass sie mir die notwendige Unterstützung zukommen ließ, obwohl Klinik und Forschung oftmals die Zeit für gemeinsame Unternehmungen eingeschränkt hat.

Meinem Bruder Mark danke ich für wissenschaftliche Ideen, Diskussionen und einen kritischen Blick während meiner Arbeit, meinen anderen Geschwistern für die moralische Unterstützung.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir Ausbildung und Studium ermöglicht haben und mich auf diesem Weg immer begleitet und voll unterstützt haben.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Stephan Tobias Herlan  
Geburtsdatum: 25.08.1979  
Geburtsort: Bad Friedrichshall  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

08/1986 – 07/1990 Neuberg Grundschule, Neckarsulm  
08/1990 – 05/1999 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Neckarsulm  
05/1999 Abitur, Albert-Schweitzer-Gymnasium, Neckarsulm

### Berufsausbildung:

11/1999 – 10/2002 Ausbildung zum Physiotherapeuten an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen  
09/2002 – 10/2002 Abschluss der Physiotherapieausbildung mit dem Staatsexamen und Erwerb der Berufsbezeichnung Physiotherapeut

### Hochschulbildung:

11/2003 – 01/2009 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Vorklinischer und klinischer Abschnitt  
01/2008 – 01/2009 Praktisches Jahr in Tübingen und Reykjavík  
09/03/2005,24/03/2005 Ärztliche Vorprüfung, Regierungspräsidium Stuttgart  
23/04/2009,10/06/2009 2. Ärztliche Prüfung, Regierungspräsidium Stuttgart  
16/06/2009 Approbation als Arzt, Regierungspräsidium Stuttgart  
seit 04/2007 Beginn der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. R. Weissert am Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Abteilung allgemeine Neurologie, Neuroimmunologie, Universität Tübingen  
seit 07/2009 Facharztausbildung für Neurochirurgie  
Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Marcos Tatagiba  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Klinische Anatomie an der Universität Tübingen  
Leitung klinische Anatomie: Dr. Bernhard Hirt