Universität Ulm Institut für Neurologie Prof. Dr. Albert C. Ludolph

Wirkung von Fumarsäureester auf Oligodendrozyten hinsichtlich der Amyotrophen Lateralsklerose

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

> vorgelegt von Kristina Schmauder aus Reutlingen 2016

> > I

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. C. Ludolph
- 2. Berichterstatter: PD Dr. B. Baumann

Tag der Promotion: 23.06.2017

<u>Meiner Familie</u>

INHALTSVERZEICHNIS

IN⊦	HALT	SV	ERZEICHNIS	IV
AB	KÜR	ZU	NGSVERZEICHNIS	VI
<u>1.</u>	EIN	LE	TUNG	<u>1</u>
1	.1.	An	nyotrophe Lateralsklerose	1
1	.2.	Ro	lle der Gliazellen bei der ALS	3
1	.3.	Oli	godendrozyten und ihre Vorläufer	5
1	.4.	Fu	marsäureester/FAE	6
1	.5.	Nr	2-Signalkaskade	8
1	.6.	HI	-1α-Signalkaskade	9
1	.7.	La	ktatshuttlehypothese bei der ALS	11
1	.8.	Zie	lsetzung	13
<u>2.</u>	<u>MA</u>	<u>TEF</u>		<u>16</u>
2	2.1.	Ma	terialien und Geräte	
	2.1.	1.	Zellkultur	
	2.1	2.		
	2.1	3.	Western Blot	
	2.1.	4. r		20
	2.1.	ວ. ເ		
	2.1.	0. 7		
2	۲.۱. م	/. Mo	theden	
2	2 . 22	1	Mäuse	21 21
	2.2	2	Zellkultur	21
	2.2	<u>-</u> . 3	aPCR	26
	2.2	4	Western Blot	27
	2.2	5.	Transfektionen und Luciferase-Reporterassav	
	2.2	6.	VEGF-ELISA	
	2.2	7.	Laktatassay	
	2.2	8.	Statistische Auswertung	
<u>3.</u>	<u>ER</u>	<u>GE</u> I	BNISSE	<u> 3</u> 3
3	3.1. Reinheit der Primärkulturen			

3.2. Einfluss von FAE auf die Nrf2-Signalkaskade 34

3.2.2	1. Nrf2-Zielgeninduktion durch FAE in OLN-93 und Wildtyp-OPCs 34
3.2.2	2. Verhalten des Nrf2-Proteins nach FAE-Stimulation in Wildtyp-OPCs 37
3.3.	Auswirkungen von FAE auf den HIF-1α-Signalweg
3.3.1	1. HIF-1 α -Zielgeninduktion durch FAE in OLN-93 und Wildtyp-OPCs 38
3.3.2	2. Stabilisierung von HIF-1α durch DMF in Wildtyp-OPCs
3.3.3	3. VEGF-Überproduktion durch FAE in OLN-93 und Wildtyp-OPCs 43
3.4.	Vermittlung der FAE-Effekte in OLN-93 über Nrf2 und HIF-1 α
3.5.	Effekte der FAE auf die Laktatshuttlehypothese in OLN-93 und
Wildty	/p-OPCs
3.6.	Untersuchung von OPCs aus mSOD1(G93A)-Mäusen 52
3.6.2	1. FAE-Einfluss auf die Nrf2-Signalkaskade in transgenen OPCs 52
3.6.2	2. FAE-Einfluss auf die HIF-1 α -Signalkaskade in transgenen OPCs 54
3.6.3	3. FAE-Einfluss auf die Laktatshuttlehypothese in transgenen OPCs 56
<u>4.</u> DISI	KUSSION
4.1.	Einsatz von FAE bei der ALS 59
4.2.	Relevanz der untersuchten Signalwege bei der ALS
4.3.	ALS und VEGF
4.4.	ALS und Laktat
4.5.	ALS und Oligodendrozyten 66
4.6.	Oligodendrozyten versus Astrozyten bei der ALS
4.7.	FAE-Derivate in der Diskussion69
4.8.	HIF-1α und MS
4.9.	Fazit
<u>5.</u> <u>ZUS</u>	AMMENFASSUNG73
<u>6. LITE</u>	RATURVERZEICHNIS
<u>7.</u> DAN	IKSAGUNG
8. LEB	ENSLAUF

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Varianzanalyse / Analysis of Variance
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	antioxidatives Responseelement
ATP	Adenosintriphosphat
BG-12	Studienname von Dimethylfumarat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNTF	ziliärer neurotrophischer Faktor
C9orf72	Chromosom 9 open reading frame 72
DEF	Diethylfumarat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DN Nrf	dominant-negatives Nrf
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Saline
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAE	Fumarsäureester
fALS	familiäre ALS
FCS	fetales Kälberserum
Fus	Fused in Sarcoma
GFAP	Saures Gliafaserprotein / Glial fibrillary acidic protein
Glut-1	Glukosetransporter 1
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HO-1	Hämoxygenase 1
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRE	Hypoxie-responsives Element

HRP	Meerrettichperoxidase
lba1	ionisiertes calciumbindendes Adaptermolekül 1
KEAP1	Kelch-like ECH-assoziiertes Protein 1
Ldha	Laktatdehydrogenase A
М.	Morbus
MAG	Myelinassoziiertes Glykoprotein
MBP	basisches Myelinprotein
MCT-1	Monocarboxylattransporter 1
MEF	Monoethylfumarat
MMF	Monomethylfumarat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
mSOD1	mutiertes SOD1
NF-ĸB	Nukleärer Faktor ĸB
NG2	neurales/gliales Antigen 2
NQO1	NAD(P)H-Quinone-Oxidoreduktase 1
Nrf2	Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like 2
OLN-93	Oligodendrozytenzelllinie OLN-93
OPC	Oligodendozytenvorrläuferzelle
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PBST	Phosphatgepufferte Saline + Tween®
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-α	Thrombozytenwachstumsfaktor α / Platelet-derived growth factor α
PDHA	Pyruvatdehydrogenase A
PHD	Prolylhydroxylase domain-containing protein
PLL	Poly-L-Lysin
Pol2	RNA-Polymerase 2
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROS	radikale Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
shRNA	small hairpin RNA
SOD1	Superoxiddismutase 1
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TDP-43	Transaktives Response-DNA-bindendes Protein 43 kDa
TEMED	Tetramethylethylendiamin
ТМВ	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZNS	zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. Amyotrophe Lateralsklerose

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine rasch fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, die mit einer Inzidenz von etwa 2-3/100.000 in der europäischen Bevölkerung auftritt (Chio et al., 2009; Logroscino et al., 2010). Sie ist die häufigste aller unter dem Begriff der Motoneuronerkrankungen subsummierten Erkrankungen. Die ALS tritt bei Männern mit einer Verteilung von 1,3:1 etwas häufiger als bei Frauen auf und hat einen Gipfel an Neuerkrankten zwischen dem 65. und 74. Lebensjahr (Chio et al., 2009; Logroscino et al., 2010). Zum jetzigen Zeitpunkt erfolgt die Diagnosestellung anhand genetischer oder klinischer Tests, wobei noch kein Biomarker etabliert ist, über den die ALS diagnostiziert werden kann (Brooks et al., 2000). Symptomatisch lassen sich Muskelkrämpfe, Faszikulationen, Spastiken und bulbäre bzw. spinale Paresen beobachten, die sich in Sprech- und Schluckstörungen oder motorischen Beeinträchtigungen an Extremitäten und Rumpf im Sinne einer meist asymmetrisch beginnenden Atrophie oder Schwächesymptomatik äußern (Kiernan et al., 2011). Bei Fortschreiten der ALS verschlechtern sich die Paresen progredient bis hin zur körperlichen Invalidität und Mitbeteiligung des Zwerchfells mit Manifestation einer respiratorischen Insuffizienz im Endstadium der Erkrankung. Nach Symptombeginn kommt es regelhaft innerhalb von drei bis fünf Jahren zum Tod (Robberecht und Philips, 2013; Talbot, 2009).

Die beschriebenen Symptome werden durch den Untergang des ersten und zweiten Motoneurons im ZNS hervorgerufen, in denen mikroskopisch charakteristische Veränderungen auftreten. Vergleichbar mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer sind bei der ALS intraneuronale zytoplasmatische Aggregatbildungen durch verschiedene Makromoleküle zu beobachten und es treten axonale Schwellungen als Zeichen einer neuronalen Degenerationen auf (Bruijn et al., 1998; Deng et al., 2010; Neumann et al., 2006; Okamoto et al., 1990). In etwa 5-10% der Fälle im Menschen findet sich eine hereditäre Disposition für das Auftreten der ALS (Leigh et al., 2003; Sreedharan und Brown, 2013), die dann als familiäre ALS (fALS) bezeichnet wird. sich unter anderem Mutationen in Genen wie SOD1 Hierbei finden (Superoxiddismutase 1), TDP-43 (Transaktives Response-DNA-bindendes Protein

43 kDa), Fus (Fused in Sarcoma) und dem erst kürzlich entdeckten und am häufigsten betroffenen Gen C9orf72 (Chromosom 9 open reading frame 72) (Brettschneider *et al.*, 2013; Kwiatkowski *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2007; Renton *et al.*, 2011; Rosen, 1993). Über verschiedene Tiermodelle stehen Möglichkeiten zur pathogenetischen Untersuchung der ALS zur Verfügung, wobei die transgene highcopy-SOD1-Mausmutante mSOD1(G93A) das älteste ALS-Tiermodell darstellt. Bei diesem Modell wird das an der 93. Basenposition mutierte humane SOD1-Gen unter der Kontrolle des humanen SOD1-Promotors in Mäusen mit 20-24 Kopien überexprimiert (McGoldrick *et al.*, 2013). Ein Vorteil neben seines langjährig etablierten Status besteht darin, dass die highcopy-SOD1-Mausmutante mSOD1(G93A) im Vergleich zu vielen anderen ALS-Tiermodellen den humanen ALS-Phänotyp krankheitsgetreu nachahmt (Dal Canto und Gurney, 1994; Gurney, 1994).

Weshalb die unterschiedlichen Mutationen im Detail ursächlich für das Auftreten der ALS sind, ist bisher weitestgehend unbekannt. Mutationen im SOD1-Gen treten beim Menschen mit einer Häufigkeit von 15-20% bei der fALS auf und werden über einen autosomal-dominanten Vererbungsmechanismus an die kommende Generation weitergegeben (Talbot, 2009). Bei der Veränderung im SOD1-Gen als die erste beschriebene Ursache für die Entstehung einer ALS kommt es meist über Missense-Mutationen in der Mehrzahl der Fälle zu einem Funktionszugewinn (gainof-function) des Enzyms Cu/Zn-Superoxiddismutase 1, was dessen Funktion des Abbaus von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) verändert (Al-Chalabi et al., 2012; Andersen et al., 1995; Beckman et al., 2001). Unter physiologischen Bedingungen schützt die Aktivität der Cu/Zn-Superoxiddismutase 1 die Zelle über den Abbau von Superoxidradikalen (O_2^{-}) zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) vor Schädigung durch oxidativen Stress (Tainer et al., 1982). Paradoxerweise entwickelt das Protein über seine mutationsbedingte Fehlfaltung trotz des Funktionszugewinns aber eine toxische Wirkung, die sich bei der ALS in der Entstehung und nicht wie erwartet der Reduktion von oxidativem Stress äußert (Dal Canto und Gurney, 1994). Die Ergebnisse von Andersen et al. (1995) legen nahe, dass dies weniger der veränderten enzymatischen Aktivität von SOD1, sondern eher der Interaktion von SOD1 mit anderen Zellbestandteilen geschuldet ist. Dass oxidativer Stress und ALS Hand in Hand gehen, zeigt sich zum Beispiel daran, dass im Liquor von ALS-Patienten Biomarker für oxidativen Stress erhöht sind, sodass

man davon ausgeht, dass diese Anhäufung von radikalen Sauerstoffspezies am Motoneuronuntergang bei der ALS zentral mitbeteiligt ist (Smith *et al.*, 1998). Für die Frage, wie diese Vorgänge ALS auslösen, gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Unter anderem führen Mutationen im SOD1-Gen eine Axonopathie und eine mitochondriale Dysfunktion in Motoneuronen herbei (Estevez *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2004). Außerdem tritt eine Induktion von Apoptose und Mikrogliaaktivierung auf (Pasinelli *et al.*, 1998; Rotunno *et al.*, 2014).

Pharmakotherapeutisch steht aktuell nur Riluzol, eine Substanz zur Hemmung der Glutamatfreisetzung aus Astrozyten, zur Verfügung, die das Fortschreiten der Erkrankung signifikant um etwa drei Monate hinauszögert (Bensimon *et al.*, 1994; Lacomblez *et al.*, 1996; Leigh *et al.*, 2003). Abgesehen von Riluzol kann die ALS trotz Testung multipler medikamentöser Ansätze zum jetzigen Zeitpunkt im Menschen nur symptomatisch behandelt werden. Es ist daher dringend nötig, neue pharmakologische Therapeutika zur Behandlung der ALS zu untersuchen.

1.2. Rolle der Gliazellen bei der ALS

Die Pathophysiologie der ALS besteht in erster Linie in einer Schädigung der Motoneurone im ZNS. Diese äußert sich unter anderem in einer Synapsenretraktion der Motoneurone von ihrer neuromuskulären Endplatte, lange bevor die ersten Symptome einer ALS auftreten (Pun *et al.*, 2006). Begleitend dazu entstehen intramotoneuronale Vakuolen durch Schädigung der Mitochondrien und Zeichen der axonalen Degeneration (Higgins *et al.*, 2003; Pun *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2002). Interessanterweise treten bei Mäusen, die das mutierte SOD1 selektiv in Motoneuronen exprimieren, per se keine Anzeichen für Neurodegeneration und Motoneuronuntergang auf (Lino *et al.*, 2002; Yamanaka *et al.*, 2008). Dies macht eine alleinige Beteiligung von Motoneuronen bei der ALS-Pathogenese eher unwahrscheinlich.

Tatsächlich finden sich in ALS-Patienten und -Tiermodellen Anzeichen dafür, dass Gliazellen funktionell beeinträchtigt sind, was eine gestörte Aufrechterhaltung des interneuronalen Mikromilieus nach sich zieht. Dass Gliazellen zumindest strukturell während der Erkrankung eine Veränderung durchmachen, entdeckten Bruijn *et al.* bereits 1998, als sie in Astrozyten Aggregatbildungen nachwiesen, die sich als SOD1-Ablagerungen herausstellten. Mittlerweile ist auch bekannt, dass wildtypische Motoneurone in einer Umgebung von Astrozyten, die das mutierte

SOD1 exprimieren, trotz fehlender eigener Pathologie zugrunde gehen (Nagai et al., 2007). Ob die SOD1-Aggregate in Astrozyten primär für die Schädigung in Motoneuronen verantwortlich sind oder nur als Kollateraleffekt zum Motoneuronuntergang auftreten, ist weiterhin umstritten. Fakt ist allerdings, dass es im Verlauf des Krankheitsprogresses durch Astrozytenproliferation mit erhöhter Expression des Astrozytenmarkers GFAP (saures Gliafaserprotein) zu einer reaktiven Astrogliose kommt (Ekegren et al., 2006). Auch Mikroglia nehmen bei der beeinflussende Rolle ALS eine relevante ein. indem sie in einen proinflammatorischen Aktivierungszustand übergehen (Hall et al., 1998; Turner et al., 2004), wobei sie anstatt einer krankheitsverursachenden eher eine den Fortschritt begünstigende Position innehaben (Boillee et al., 2006; Lobsiger und Cleveland, 2007). Gegensätzlich dazu gelingt es Wildtypgliazellen, die Überlebenswahrscheinlichkeit von Motoneuronen mit einer SOD1-Mutation signifikant zu steigern (Clement et al., 2003; Di Giorgio et al., 2007). Zusammengefasst scheinen Motoneuronerkrankungen damit essentiell durch Gliazellen mitbedingt zu sein.

Neben Astrozyten und Mikroglia konnte nun auch für Oligodendrozyten ein verändertes Verhalten bei der ALS beobachtet werden: Kennzeichnend sind Myelinveränderungen, dysmorphes Zellerscheinungsbild ein und eine wahrscheinlich kompensatorisch Proliferationsgesteigerte und Differenzierungsrate von Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs), die bereits im symptomfreien Intervall beginnen, allerdings paradoxerweise keine Änderung der absoluten Oligodendrozytenzahl hervorbringen (Kang et al., 2010; Kang et al., 2013; Magnus et al., 2008; Niebroj-Dobosz et al., 2007; Nonneman et al., 2014). Die Erkenntnis, dass sich die Anzahl an Oligodendrozyten im Rückenmark von SOD1-Mäusen bis ins Endstadium der ALS halbiert und Caspase 3 als Apoptosemarker hochreguliert wird, untermauert die Hypothese des augenscheinlichen Zelltodes von Oligodendrozyten bei der ALS (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Auch in Oligodendrozyten von Patientenpräparaten lassen sich Proteinaggregate als typisches ALS-Merkmal in Form von TDP-43 nachweisen (Brettschneider et al., 2013). In der Zusammenschau sind dies überzeugende Argumente dafür, der Rolle der Oligodendrozyten bei der ALS weiter nachzugehen.

1.3. Oligodendrozyten und ihre Vorläufer

Oligodendrozyten sind die myelinbildenden Zellen des ZNS und als solche in enger Vernetzung mit Neuronen. Über eine hochkomplexe Interaktion erhalten sich Oligodendrozyten und Axone wechselseitig am Leben (Doyle und Colman, 1993; Lappe-Siefke *et al.*, 2003): der Oligodendrozyt sorgt für funktionale Integrität und gerichteten axonalen Transport, das Axon liefert über elektrische und metabolische Aktivität für die Gliazellen überlebenswichtige und myelinisierungsfördernde Signale (Barres und Raff, 1993; Demerens *et al.*, 1996; Edgar *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 1998; Kassmann *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2001; Ziskin *et al.*, 2007). Über den Transfer von energetisch reichhaltigen Substanzen wie Laktat aus dem eigenen Stoffwechsel wirken Oligodendrozyten zudem an der Ernährung von Neuronen mit: einem Transportsystem, das unter dem Namen des Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttles bekannt ist (Funfschilling *et al.*, 2012).

Die lebensgeschichtliche Entwicklung eines Oligodendrozyten beginnt als Vorläuferzelle (OPC) und erstreckt sich über den Status des unreifen Oligodendrozyten bis zur reifen, myelinbildenden, sessilen Form (Nishiyama, 2007). Anhand verschiedener Oberflächenantigene kann eine Unterscheidung zwischen den Entwicklungsstadien erfolgen. Die OPCs exprimieren auf ihrer Oberfläche NG2 (neurales/gliales Antigen 2) und PDGF- α (Thrombozytenwachstumsfaktor α), die sich während ihrer Entwicklung zurückbilden und durch MAG (Myelinassoziiertes Glykoprotein) in unreifen Oligodendrozyten und schließlich MBP (basisches Myelinprotein) in reifen Oligodendrozyten ersetzt werden (Fancy et al., 2011; Kang et al., 2010; Levine et al., 2001; O'Meara et al., 2011). Neben der Untersuchung von OPCs im Speziellen wurden in dieser Arbeit auch Experimente an der Zelllinie OLN-93 durchgeführt, die bedingt durch die Expression der Oberflächenmarker MAG und einer frühen Form von MBP als unreife Oligodendrozyten eingestuft werden (Richter-Landsberg und Heinrich, 1996). Jede der Entwicklungsstadien besitzt typische morphologische und funktionell bedingte Eigenschaften: Neben ihrer Rolle als noch zur Mitose befähigte Stammzellen für den Oligodendrozytenpool, auf den zum Beispiel in Folge von demyelinisierender oder traumatischer Schädigung rasch zurückgegriffen werden muss, ist die Aufgabe der OPCs bisher weitestgehend unbekannt (Etxeberria et al., 2010; Kondo und Raff, 2000; Levine, 1994). Da OPC-Ausläufer nachweislich an die Internodien von Neuronen heranreichen, wird vermutet, dass sie sich auch an der Beeinflussung neuronaler Aktivität mitbeteiligen

(Butt *et al.*, 1999). Im Hinblick auf die ALS-Pathologie konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch Entfernung von mutiertem SOD1 aus OPCs der Krankheitsbeginn signifikant hinausgezögert und die Überlebenswahrscheinlichkeit gesteigert werden kann (Kang *et al.*, 2013). Durch eine noch mangelhaft ausgebildete Myelinscheidenbildung sind OPCs zur Migration durch das ZNS in der Lage (Levison *et al.*, 1999; Niehaus *et al.*, 1999): eine Eigenschaft die während des Differenzierungsvorgangs zur reifen Oligodendrozytenform verloren geht (Barateiro und Fernandes, 2014). OPCs und immature Oligodendrozyten sind im Vergleich zu reifen Oligodendrozyten durch ihre bevorstehende Ausdifferenzierung mit Beginn der Myelinsynthese und ihre hohen energetischen Ansprüche in Form von ATP auf einen oxidativen Stoffwechsel angewiesen (Funfschilling *et al.*, 2012; Yan und Rivkees, 2006; Zuppinger *et al.*, 1981). Reife Oligodendrozyten können ihr Überleben hingegen auch über Glykolyse sichern und können durch geringere Energieanforderungen wegen ihres bereits ausgereiften Haushalts aktiv am oben beschriebenen Laktatshuttle mitwirken (Funfschilling *et al.*, 2012).

1.4. Fumarsäureester/FAE

Bei der ALS gibt es bisher therapeutisch keine kurativen Ansätze, sondern nur die Möglichkeit der Riluzolgabe, die um drei Monate lebensverlängernd wirkt (Bensimon *et al.*, 1994). In jüngerer Zeit konnte in einer kontrollierten, randomisierten Studie ein zentralnervöser, neuroprotektiver Einfluss des Medikaments BG-12 auf den Krankheitsverlauf und die Rückfallrate bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) gezeigt werden (Fox *et al.*, 2012; Gold *et al.*, 2012; Kappos *et al.*, 2008). BG-12 enthält Dimethylfumarat (DMF) als aktiven Wirkstoff und erhielt 2013 unter dem Namen Tecfidera® die Zulassung für die MS-Therapie (Venci und Gandhi, 2013).

Dimethylfumarat gehört zur Arzneimittelgruppe der Fumarsäureester (FAE), worunter verschiedene Derivate zusammengefasst werden: neben DMF sollen hier im Besonderen Diethylfumarat (DEF) und Monomethylfumarat (MMF) erwähnt werden. Nach oraler Verabreichung passiert DMF unverändert den Magen und wird größtenteils im Dünndarm pH-abhängig zum potenten MMF hydrolysiert, welches als bioaktives Intermediat in die Blutbahn aufgenommen wird (Litjens *et al.*, 2004b; Werdenberg *et al.*, 2003). Im Blut kann DMF nicht mehr detektiert werden (Litjens *et al.*, 2004a). Monomethylfumarat gelangt in den Intrazellularraum und wird dort

über Esterasen zu Fumarat metabolisiert, welches in der Folge in den Zitratzyklus eingeschleust wird und als Mediator verschiedener Signalwege wirken kann (Litjens *et al.*, 2004b; Venci und Gandhi, 2013). Fumarat selbst ist ein Zwischenprodukt des Zitratzykluses und wird damit auch endogen im Körper erzeugt. In seiner unveränderten Form ist Fumarat nicht in der Lage, direkt aus dem Darm resorbiert zu werden oder Zellmembranen zu passieren, um in den Intrazellularraum für die Entfaltung einer systemischen Wirkung zu gelangen (Altmeyer *et al.*, 1994; Bomprezzi, 2015). Erst über besagte Veresterungen ist der Eintritt ins Zellinnere und damit die aktive Teilnahme am zellulären Stoffwechsel möglich.

Wie Fumarat seine Wirkung im Detail entfaltet, ist im Augenblick noch weitestgehend unbekannt. Dimethylfumarat wird seit mehreren Jahrzehnten als Hauptinhaltsstoff von Fumaderm® erfolgreich bei der Behandlung der Psoriasis verabreicht, da es zum Beispiel über die Beeinflussung der antigenpräsentierenden Zellen und der T-Zellantwort eine immunmodulatorische Wirkung besitzt (Altmeyer et al., 1994; de Jong et al., 1996; Linker et al., 2008; Peng et al., 2012; Schilling et al., 2006). Diese veränderte Immunantwort wird unter anderem durch die Hemmung des Nukleären Faktors KB (NF-KB) erklärt (Peng et al., 2012). Dieser Signalweg wird dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht werden. Der zentrale in Wirkungsmechanismus, den man sich bei der MS-Therapie zunutze macht und der auch hier näher betrachtet werden soll, besteht in der Induktion des Transkriptionsfaktors Nrf2 (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like 2), welcher an der Reduktion von zytotoxischem oxidativen Stress mitwirkt und damit eine Neuroprotektion zur Folge hat (Albrecht et al., 2012; Linker et al., 2011). Der dritte wichtige und in dieser Arbeit im Speziellen untersuchte Signalweg besteht in der Hemmung der PHD (Prolylhydroxylase domain-containing protein)-Enzymgruppe, die auch durch Hypoxie negativ beeinflusst wird (Koivunen et al., 2007). Es kommt dadurch im Verlauf zu einer Stabilisierung des Hypoxie-induzierten Faktor 1α (HIF-1α), welcher als Regulator des Sauerstoffmetabolismus und der Glykolyse eine zentrale Rolle in der Zellhomöostase spielt.

Die dienlichen Effekte vor allem der letzten beiden beschriebenen Signalwege sowie der Vorteil des langjährig pharmakologisch etablierten Status von Fumaderm® bringen DMF in die Diskussion zur Behandlung anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie zum Beispiel der ALS.

1.5. Nrf2-Signalkaskade

Neuroprotektion als Zieleffekt bei neurodegenerativen Erkrankungen wird schon seit Jahren angestrebt, aber durch die wenigsten der bisher bekannten pharmakologischen Ansätze erzielt. Erfreulicherweise konnte mit der Zulassung von BG-12 eine Möglichkeit gefunden werden, eben jenes Ziel zu erreichen. Der entscheidende Mechanismus scheint dabei die Induktion eines bestimmten Transkriptionsfaktors zu sein, der sich Nrf2 (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)like 2) nennt (Burness und Deeks, 2014). Nrf2 übt intrazellulär die verschiedensten Funktionen aus: erstens bewirkt Nrf2 in multiplen Geweben als Reaktion auf variable Noxen, wie z.B. radikale Sauerstoffspezies (ROS), Karzinogene oder Entzündungsvorgänge eine Antistressreaktion beispielsweise in Form einer Induktion von Hitzeschockproteinen (Lee et al., 2005); zweitens werden zur körpereigenen Entgiftung via Nrf2 Phase-II-Enzyme der Biotransformation wie z.B. Glutathion überexprimiert (Wierinckx et al., 2005); drittens finden sich Hinweise auf antiinflammatorische Geschehen nach Nrf2-Induktion (Lin et al., 2011); außerdem kommt Nrf2 eine essentielle Bedeutung bei der oxidativen Stressreduktion zu, welche maßgeblich die besagte Neuroprotektion mitbedingt (Ellrichmann et al., 2011; Linker et al., 2011); nicht zuletzt wird Nrf2 ein Beitrag zum Erhalt der Myelinscheiden im ZNS zuteil (Hubbs et al., 2007).

MMF spielt bei der Induktion von Nrf2 eine entscheidende Rolle, da es ebenso wie die oben beschriebenen Stressoren dessen Bindung an seinen Inhibitor und Degradationsfaktor KEAP1 (Kelch-like ECH-assoziiertes Protein 1) löst und dem Transkriptionsfaktor damit die Translokation in den Nukleus und die Ausübung seiner Aufgaben am Genom über die Bindung an antioxidative Responseelemente (ARE) in der Promotorregion von verschiedenen antioxidativen und entgiftenden Genen ermöglicht (Itoh et al., 1997; Itoh et al., 1999; Linker et al., 2011; Venugopal und Jaiswal, 1996). Interessanterweise ist diese Induktion im ZNS vor allem in Gliazellen vorzufinden, während die Expression von Nrf2 in Neuronen vergleichsweise gering ausfällt (Kraft et al., 2004; Linker et al., 2011). Ausschlaggebend für die weitere Wirkung ist die darauffolgende Überexpression von Nrf2-Zielgenen wie beispielweise der Hämoxygenase 1 (HO-1) und der NAD(P)H-Quinone-Oxidoreduktase-1 (NQO1) (Chen et al., 2006; Dhakshinamoorthy und Jaiswal, 2000).

HO-1 gehört zur Gruppe der Hitzeschockproteine und reagiert sensitiv auf Sauerstoffradikale (Ghoreschi *et al.*, 2011; Keyse und Tyrrell, 1989). Eine wichtige Aufgabe, die von HO-1 erfüllt wird und die vor allem dann deutlich wird, wenn Zellen ein Defizit in der HO-1-Synthese aufweisen, ist der Abbau dieser Radikale (Poss und Tonegawa, 1997). NQO1 spielt als Phase-II-Enzym bei der Biotransformation von metabolischen Abfallstoffen wie z.B. dem Radikalbildner Quinon eine zentrale Rolle und ist darüber hinaus in der Signalkaskade zur Induktion von Glutathion, dem effektivsten körpereigenen Antioxidans, zwischengeschaltet (Albrecht *et al.*, 2012). Die Mehrsynthese von Glutathion nach FAE-Stimulation kommt den umgebenden Neuronen sekundär zugute, da deren Mikromilieu damit von ROS bereinigt wird und sie resistenter gegenüber oxidativer Schädigung werden (Satoh *et al.*, 2009).

In Hinblick auf die ALS konnten in spezifischen Mausmodellen durch eine Stimulation des Nrf2-Signalwegs prognoseverbessernde Effekte erreicht werden (Neymotin *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2008).

1.6. HIF-1α-Signalkaskade

Hypoxie stellt für Körperzellen einen lebensbedrohlichen Zustand dar, den es dringlichst zu kompensieren gilt. Zu diesem Ziel haben sich körpereigene Mechanismen entwickelt, die dem entgegensteuern können. Einer davon ist die Akkumulation des Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1), einem Makromolekül, das sich aus dem induzierbaren und 120 kDa schweren Teil HIF-1α und dem konstitutiv HIF-1β zusammensetzt vorhandenen Gegenstück und darüber einen Transkriptionskomplex bildet (Jewell et al., 2001; Semenza und Wang, 1992; Wang und Semenza, 1995). Unter Normoxie wird HIF-1α über eine Enzymgruppe, die sich PHD-Enzymgruppe nennt, durch Hydroxylierungsschritte mit rascher Geschwindigkeit der Degradation über Ubiquitinylierung zugeführt (Jewell et al., 2001; Masson et al., 2001). Hypoxie bewirkt die Inhibition dieser PHD-Enzymgruppe (Bruick und McKnight, 2001; Epstein et al., 2001). Dadurch kann HIF-1a akkumulieren und mit HIF-1ß aggregieren, was dem Komplex die Möglichkeit eröffnet. über die Bindung an HRE (Hypoxie-responsive Elemente) in Promotorregionen verschiedener Zielgene seine transkriptionelle Aktivität auszuüben (Jewell et al., 2001; Semenza und Wang, 1992). Damit werden Zielgene induziert, die zum Zweck der Kompensation die Sauerstoffversorgung der Gewebe optimieren und damit die Zellhomöostase wiederherstellen: so wird beispielsweise

die vaskuläre Versorgung verbessert und der Stoffwechsel auf die im Vergleich zur Atmungskette weniger sauerstoffbedürftige Glykolyse zur Energiedeckung umgestellt (Seagroves *et al.*, 2001; Semenza, 2011; Stroka *et al.*, 2001). Dafür sind unter anderem Zielgene wie der Glukosetransporter Glut-1, der Wachstumsfaktor VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), die Laktatdehydrogenase A (Ldha) und die Pyruvatdehydrogenase A (PDHA) verantwortlich (Nazarewicz *et al.*, 2013; Semenza, 2003).

Glut-1 ist ein Glukosetransporter und ein direktes Zielgen, das mittels HIF-1α überexprimiert werden kann (Behrooz und Ismail-Beigi, 1997; Simpson *et al.*, 2007). Über ihn gelangt Glukose in den Intrazellularraum, wo zügig eine Einschleusung in die Glykolyse erfolgt (Semenza, 2010). Da die Transportkapazität von Glut-1 limitiert ist, erfolgt als Antwort auf Sauerstoffmangelsituationen eine Steigerung der Transporterdichte, die unter anderem durch eine erhöhte Transkription erfolgt. Als Folge der gesteigerten Transporterdichte sind eine gesteigerte Glukoseaufnahme und eine glykolytische Energiegewinnung möglich (Behrooz und Ismail-Beigi, 1999).

Im Anschluss an die Glykolyse kommt das nächste Zielgen von HIF-1 α , die Pyruvatdehydrogenase A, ins Spiel, die Pyruvat zum Substrat hat und von HIF-1 α im Sinne einer Expressionshemmung reguliert wird (Nazarewicz *et al.*, 2013). Dies verfolgt das Ziel der Umverteilung des Stoffwechsels von der aeroben hin zur anaeroben Glykolyse, um trotz des hypoxischen Zustands eine fortlaufende Energieproduktion sicherzustellen (Semenza, 2010). In diesem Zusammenhang wird demnach auch die Laktatdehydrogenase A von HIF-1 α induziert, um das durch die PDHA-Hemmung anfallende Pyruvat auf einem alternativen Weg weiterzuverarbeiten und so eine energetisch und metabolisch schädliche Anhäufung zu vermeiden (Bruick und McKnight, 2001). Damit wird als Nebeneffekt zusätzlich Laktat erzeugt (Pellerin *et al.*, 1998).

Zu guter Letzt nimmt HIF-1α über die Überexpression von VEGF Einfluss auf die vaskuläre Gewebsversorgung, die indirekt mit einer besseren Nährstoff- und Sauerstoffanlieferung verknüpft ist (Forsythe *et al.*, 1996; Shweiki *et al.*, 1992). VEGF ist ein Wachstumsfaktor und mit an der Induktion und dem Erhalt von Gefäßen beteiligt (Ferrara *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1989). Außerdem werden unter VEGF neuroprotektive und neurotrophe Effekte sowie eine Steigerung des axonalen Wachstums beobachtet (Jin *et al.*, 2000; Sondell *et al.*, 1999).

ALS und HIF-1α bzw. dessen Zielgen VEGF sind eng miteinander verwoben. In einem Mausmodell, dem über Knock-out der HRE im VEGF-Gen die Möglichkeit der gezielten Reaktion auf HIF-1α fehlt, entstehen Symptome einer ALS (Oosthuyse *et al.*, 2001). Im Liquor von ALS-Patienten sind die VEGF-Spiegel im Vergleich zu Kontrollen erniedrigt und zusätzlich findet als Reaktion auf Hypoxie nur eine mangelhafte VEGF-Produktion statt (Devos *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2006). Damit gerät Hypoxie oder die dysfunktionale Reaktion auf diese mit einer begleitenden Mangelversorgung von Motoneuronen in die Diskussion der mitverursachenden Pathomechanismen der ALS.

HIF-1 α kann neben Hypoxie auch durch FAE stabilisiert werden (Koivunen *et al.*, 2007; Serra-Perez *et al.*, 2010). Der zugrundeliegende Mechanismus ist dabei vergleichbar mit der Wirkung von Hypoxie, allerdings ohne den Einfluss eines tatsächlichen Sauerstoffmangels, weshalb sich für dieses Phänomen der Begriff der ,pseudohypoxischen Reaktion' eingebürgert hat (Arbiser, 2011; Isaacs *et al.*, 2005; MacKenzie *et al.*, 2007). Im ZNS besitzt Fumarat gliazellspezifisch einen anregenden Einfluss auf die HIF-1 α -Signalkaskade, während Neurone keine Veränderung in Form einer HIF-1 α -Akkumulation zeigen (Wiesner *et al.*, 2013). Es ist daher anzunehmen, dass den Neuronen die zuträglichen Effekte besagter HIF-1 α -Akkumulation nur indirekt über Gliazellen zugutekommen.

1.7. Laktatshuttlehypothese bei der ALS

Neurone sind in hohem Maße von einer ausreichenden ATP-Versorgung abhängig, die bekanntermaßen vor allem durch die oxidative Phosphorylierung von Glukose in der Atmungskette sichergestellt wird (Saab *et al.*, 2013). Zusätzlich haben Neurone in Notzeiten wenig Spielraum, ihre Glykolyseaktivität hochzuregulieren, um die überlebenswichtige ATP-Produktion sicher zu stellen (Almeida *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu sind Astrozyten und reife myelinbildende Oligodendrozyten weniger energiebedürftig und können ihren Stoffwechsel daher auch zum Teil über Glykolyse aufrechterhalten (Funfschilling *et al.*, 2012; Lovatt *et al.*, 2007; Morland *et al.*, 2007). Eine interessante Entdeckung machten Brown *et al.* 2001, als sie Nervenzellen in glukosefreiem Medium kultivierten und die funktionelle Aktivität des Neurons weiterhin bestehen blieb, sofern Laktat dem Medium hinzugefügt wurde. Laktat stellt einen wichtigen Nährstoff im ZNS dar. Nach ischämischen Geschehen wirkt Laktat der Ausdehnung des Infarktes entgegen und hilft, die Synapsenfunktion

wiederherzustellen (Berthet *et al.*, 2009; Schurr *et al.*, 1997). Damit kann die Wirkung von Laktat als neuroprotektiv eingeordnet werden (Berthet *et al.*, 2012; Cater *et al.*, 2001). Die Möglichkeit der Neurone, Laktat als alternativen Energielieferanten zu nutzen und die Eigenschaft von Gliazellen, über die Glykolyse Laktat als Nebenprodukt zu erzeugen, legt die Existenz einer metabolischen Kopplung dieser beiden Zelltypen nahe, die den Neuronenerhalt in Mangelzeiten sicherstellt.

Funfschilling et al. (2012) propagierten die Hypothese eines Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttles, bei dem über anaerobe Glykolyse überschüssig gebildetes Laktat über den Transporter MCT-1 (Monocarboxylattransporter 1) auf Oligodendrozyten in den Extrazellularraum gelangt und von Motoneuronen mittels einer zweiten Laktattransporterisoform (MCT-2) reimportiert wid. Dort angelangt folgt eine Rückumwandlung in Pyruvat, welches über den Zitratzyklus und die Atmungskette in ein Vielfaches an Energie im Vergleich zur glykolytischen Verstoffwechslung umgewandelt wird. Damit wird der Energiebedarf der Neurone mithilfe der Oligodendrozyten zusätzlich abgesichert. Empirisch unterstützt wird dieses Modell von der Beobachtung, dass bei Inhibiton des MCT-1-Transporters Motoneurone absterben, die allerdings durch Substitution von Laktat wieder gerettet werden können (Lee et al., 2012). Die Oligodendrozyten selbst werden von dieser Transporterhemmung morphologisch und funktionell ansonsten jedoch wenig beeinflusst. Unter den Neuronen scheinen vor allem Motoneurone von dieser Art der Nahrungszufuhr abhängig zu sein, da sie bedingt durch ihre langen Axone weite Transportwege unter anderem auch für energetisch reichhaltige Metabolite vom Soma zu überbrücken haben, die dank des Shuttlemechanismus wesentlich verkürzt werden (Nave, 2010b).

Der Motoneuronuntergang bei der ALS wird vielfach mit einem gestörten Energiemetabolismus im ZNS in Verbindung gebracht. Tatsächlich gibt es zwischen beiden Thematiken viele Berührungspunkte, was unter anderem ein Experiment von Browne *et al.* (2006) zeigt, bei dem ein gestörter Glukosestoffwechsel in Motorregionen von SOD1-Mäusen bereits lange vor Symptombeginn beschrieben wird. Auch in Bezug auf die Laktatshuttlehypothese wird diskutiert, ob der Shuttlemechanismus bei der ALS auf Höhe der Oligodendrozytenachse geschädigt ist: in transgenen SOD1-Mäusen herrscht durch verringerte Expression ein Mangel an MCT-1 in neu entstandenen Oligodendrozyten mit dysfunktionaler metabolischer

Unterstützung von Motoneuronen (Philips *et al.*, 2013). Vergleichbare Erkenntnisse wie im Tiermodell konnten auch in ALS-Humanpräparaten gewonnen werden, wo MCT-1 ebenfalls verringert exprimiert ist (Lee *et al.*, 2012). Zumindest in den besagten ALS-Mäusen verändert SOD1 dabei die Expression von MCT-1 posttranskriptionell (Philips *et al.*, 2013). Die Umkehr dessen, nämlich die Reintegration von MCT-1, gelang Kang *et al.* (2013) in OPCs über Knock-out von SOD1. Als wichtiges Merkmal bringt der Knock-down von MCT-1 in den Mäusen eine ALS-ähnliche Symptomatik hervor (Lee *et al.*, 2012). Dies unterstreicht die Glaubwürdigkeit der Aussage, dass das Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttle in der ALS geschädigt ist, zusätzlich.

In der Zusammenschau stellt sich damit die Frage, ob das Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttle als möglicher Angriffspunkt für die ALS-Therapie dienen kann, indem über eine Stimulation die metabolische Situation der Motoneurone optimiert werden kann.

1.8. Zielsetzung

Bisher ist nicht hinreichend untersucht, ob Fumarsäureester (FAE) die Signalwege Nrf2, HIF-1α sowie das Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttle in von Oligodendrozytenvorläufern (OPCs) und der Zelllinie OLN-93 beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob diese Zellen über die Induktion von Nrf2 einen Beitrag zur Neuroprotektion leisten können. Weiterhin finden sich zum jetzigen Zeitpunkt in der Literatur keinerlei Anhaltspunkte dafür, ob speziell Oligodendrozytenvorläufer auf FAE mit einer Stabilisierung von HIF-1a antworten und dies von den umgebenden Motoneuronen in einer gewinnbringenden Art und Weise genutzt werden könnte. Es ist außerdem noch offen, ob mit FAE zum Beispiel über eine Stabilisierung von HIF-1a mit Glykolyseinduktion und Steigerung der Laktatproduktion auch eine Anregung des Laktatshuttles möglich ist. Die Untersuchungen des Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttles beschränken sich auf reife Oligodendrozyten und lassen die Beteiligung von OPCs außer Acht. Welche Rolle die Stimulation dieser Signalkaskaden in transgenen ALS-Mäusen spielt und ob sie sich in vergleichbarem Ausmaß mit FAE stimulieren lassen wie OPCs aus Wildtypmäusen, wissen wir ebenfalls noch nicht. Diese Punkte werden daher in dieser Arbeit näher untersucht.

Für die Untersuchung dieser bisher noch bestehenden Erkenntnislücken wurden drei Hypothesen formuliert:

- (I) FAE stabilisieren HIF-1α in OPCs und der Zelllinie OLN-93
- (II) FAE induzieren Nrf2 in OPCs und der Zelllinie OLN-93
- (III) FAE steigern die Laktatproduktion in OPCs und der Zelllinie OLN-93



Abb. 1 Schematische Darstellung der drei in dieser Arbeit thematisierten Signalwege. Veranschaulichung eines Oligodendrozyten (hellblau) mit Darstellung der Wirkung von Fumarsäureester (FAE; grün) auf drei Signalwege (rot): Signalgebung über den Hypoxie-induzierten Faktor 1α (HIF-1α) über Hypoxie-responsive Elemente (HRE) mit Induktion des neuroprotektiven vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und dem Glukosetransporter Glut-1, Signalgebung über Nrf2 (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like 2) mit Induktion der antioxidativen Hämoxygenase 1 (HO-1) bzw. Signalgebung über die Induktion des Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttles. Über die Erhöhung der Glykolyserate über HIF-1α scheint eine Verbindung zum Shuttlemechanismus zu bestehen, indem darüber vermehrt Laktat anfällt, das über MCT-1 (Monocarboxylattransporter 1) aus dem Oligodendrozyten ausgeschleust wird und über MCT-2 (Monocarboxylattransporter 2) in Neurone (weiß) aufgenommen werden kann. Im Neuron erfolgt die Rückumwandlung von Laktat in Pyruvat mit Verstoffwechslung zu ATP (Adenosintriphosphat) zur Energiegewinnung.

Der Versuchsaufbau gliedert sich in zwei Teile: zum Zweck der ersten groborientierenden Einschätzung der Reaktion von Oligodendrozyten wurden zuerst Versuche an der immortalisierten Rattenzelllinie OLN-93 durchgeführt

(Richter-Landsberg und Heinrich, 1996). Da OLN-93 durch die Immortalisierung ein abweichendes Bild zur wirklichen Zellphysiologie von Oligodendrozyten zeigen könnten, wurden über die Anwendung des Protokolls von O'Meara *et al.* von 2011 in einem zweiten Schritt primäre OPCs aus Mäusebabys gewonnen und über deren Untersuchung ein genaueres Abbild der Zellphysiologie der Vorläufer erfasst. Das Verhalten von OPCs mit einem ALS-Hintergrund wurde mit Hilfe von transgenen Mäusen mit der mSOD1(G93A)-Mutation untersucht. Die drei FAE-Abkömmlinge, die dabei zum Einsatz kamen, sind das oben beschriebene DEF, sowie DMF und dessen Abbauprodukt MMF.

Diese Art des Versuchsaufbaus ermöglicht die differenzierte Erforschung der drei Fragestellungen dieser Arbeit. Wir erhoffen uns damit, FAE als potentielle Behandlungsmethode bei der ALS besser beurteilen zu können und die zugrunde liegenden Mechanismen zu entschlüsseln.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Zellkultur

Materialien und Geräte	Hersteller	Katalognr.
3,3'4-Triiod-L-Thyronin	Sigma Aldrich	# T6397
Agarose	Lonza	# 50004
B27 [®] -Supplement	Invitrogen	# 08-0085SA
CNTF	PeproTech	# 450-50
destilliertes Wasser Ampuva®	Fresenius Kabi	
Diethylfumarat	Sigma Aldrich	# D95654
Dimethylfumarat	Sigma Aldrich	# 242926
DMEM incl. Phenolrot (+ 1% GlutaMAX / + 4,5 g/l D- Glukose / + L-Glutamin / + Pyruvat)	Invitrogen	# 31966-047
DMEM ohne Phenolrot (+ 4,5 g/l D-Glukose / - L-Glutamin / - Pyruvat)	Invitrogen	# 31053-028
DMSO	Sigma Aldrich	# D2650
DNA-Leiter	Thermo Scientific	# SM0311
DNase I	Wortington	# LS-002139
DPBS (-) (- CaCl ₂ / - MgCl ₂)	Invitrogen	# 14190-094
DPBS (+) (+ CaCl ₂ / + MgCl ₂)	Invitrogen	# 14040-091
DreamTaq™	Fermentas	# K1081
EDTA	Sigma Aldrich	# E5134
Essigsäure	Sigma Aldrich	# 33209
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich	# E1510
FCS	BioChrome	# S0615
GlutaMAX™	Invitrogen	# 35050-038
Holo-Transferrin	Sigma Aldrich	# T0665
Insulin	Invitrogen	# 12585-014
Laminin	Sigma Aldrich	# L2020
L-Cystein	AppliChem	# A3634
L-Thyroxin	Sigma Aldrich	# 89430
Monomethylfumarat	Sigma Aldrich	# 651419
Papainlösung	Wortington	# LS003124

PCR-Primer	Thermo Scientific	
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen	# 15140-122
Petrischalen 100x20 mm	Sarstedt	# 83.1802
Petrischalen 60x15 mm	Greiner bio-one	# 628160
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma Aldrich	# P2636
Progesteron	Sigma Aldrich	# P8783
Putreascine	Sigma Aldrich	# P7505
QuickExtrakt™	Epicentre	# QE09050
Sodiumselenit	Sigma Aldrich	# S5261
Trypsin/EDTA	Invitrogen	# 25200-056
Tryptanblau	Sigma Aldrich	# T8154
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Sarstedt	# 83.1810.302
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt	# 83.1813.30
Zellkulturplatten 24 Well	BD Falcon	# 353847
Zellkulturplatten 6 Well	BD Falcon	# 353846
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf	
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus	
Schüttler 3005	GFL	
Zentrifuge 5810R	Eppendorf	

PCR-Primer (gegen DNA)	Primersequenzen
SOD 42 (Interleukin2-antisense)	5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'
SOD 43 (Interleukin2-sense)	5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC-3'
SOD 113 (hSOD1-sense)	5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3'
SOD 114 (hSOD1-antisense)	5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3'

2.1.2. qPCR

Materialien und Geräte	Hersteller	Katalognr.
DTT	AppliChem	# A2948
Ethanol	Sigma Aldrich	# SZBE0710V
iScript™ cDNA-Synthesekit	BioRad	# 170-8891
Klebefolien	BioRad	# MSB1001
PCR-Platten 96 Well	BioRad	# HSP9601

qPCR-Primer	Thermo Scientific	
RNeasy [®] Micro-Kit	Qiagen	# 74004
RNeasy [®] Mini-Kit	Qiagen	# 74106
SYBR [®] -Green	BioRad	# 170-8885
Zellschreddersäuren	Qiagen	# 79656
CFX96 Touch™ Real-Time System Thermal Cycler C1000	Bio Rad	
Megafuge 1.0 R	Heraeus	
NanoDrop™2000UV-VisSpectrophotometer	Thermo Scientific/Peqlab	
Personal Thermocycler	Biometra	
Zentrifuge 5417R	Eppendorf	

qPCR-Primer (gegen mRNA)	Primersequenzen
β-Actin	for 5' CCA CCA GTT CGC CAT GGA T 3'
	rev 5' GGC TTT GCA CAT GCC GGA G 3'
Glut-1	for 5' ATG GAT CCC AGC AGC AAG 3'
	rev 5' CCA GTG TTA TAG CCG AAC TGC 3'
HO-1	for 5' GTC AAG CAC AGG GTG ACA GA 3'
	rev 5' ATC ACC TGC AGC TCC TCA AA 3'
HPRT	for 5' GGA GCG GTA GCA CCT CCT 3'
	rev 5' CTG GTT CAT CGC TAA TCA C 3'
Ldha	for 5' GGC ACT GAC GCA GAC AAG 3'
	rev 5' TGA TCA CCT CGT AGG CAC TG 3'
MCT-1	for 5' GAT GGA CCT CAT TGG ACC CC 3'
	rev 5' GAG GCG GCC TAA AAG TGG T 3'
NQO1	for 5' AGC GTT CGG TAT TAC GAT CC 3'
	rev 5' AGT ACA ATC AGG GCT CTT CTC G 3'
Nrf2	for 5' CAT GAT GGA CTT GGA GTT GC 3'
	rev 5' CCT CCA AAG GAT GTC AAT CAA 3'
PDHA	for 5' GAA GAT GCT TGC CGC TGT ATC 3'
	rev 5' AAA TTA CGG GAA GCA ACC AGC 3'
Pol2	for 5' GCT GGG AGA CAT AGC ACC A 3'
	rev 5' TTA CTC CCC TGC ATG GTC TC 3'
VEGF	for 5' TGA TCA GAC CAT TGA AAC CAC T 3'
	rev 5' GGA AGG GTA AGC CAC TCA CA 3'

2.1.3. Western Blot

Materialien und Geräte	Hersteller	Katalognr.
Acrylamid	AppliChem	# A3626
Anti-β-Actin-Antikörper (aus mouse)	Sigma Aldrich	# A5441
Anti-HIF-1α-Antikörper (aus rabbit)	Novus Biologicals	# NB100-449
Anti-NG2-Antikörper (aus rabbit)	Millipore	# AB5320
Anti-Nrf2-Antikörper (aus rabbit)	Santa Cruz	# SC-722
APS	Sigma Aldrich	# A9164
Bromphenolblau	Sigma	# B-8026
BSA	AppliChem	# A1391
Chromatographiepapier	Whatman	# 3030917
Dinatriumhydrogenphosphat	VWR	# 28029.292
ECL-Substrat	Millipore	# WBLUF0500
Glycerol	Sigma Aldrich	# 49781
Glycin	Sigma Aldrich	# 33226
Goat-anti mouse IgG HRP-Konjugat	BioRad	# 172-1011
Goat-anti rabbit IgG HRP-Konjugat	BioRad	# 172-1019
Isopropanol	VWR	# 20842.330
Kaliumchlorid	CalBioChem	# 529552
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	# 104871
Proteinfärbekit für PVDF-Membranen	Thermo Scientific	# 24585
β-Mercaptoethanol	AppliChem	# A1108
Methanol	Sigma Aldrich	# 32213
Microtestplatten 96 Well	Sarstedt	# 82.1581
Milchpulver	Carl Roth	# T145.2
Natriumazid	Merck	# 822335
Natriumchlorid	Sigma Aldrich	# 31434
Natriumdeoxycholat	AppliChem	# A1531
Nitrozellulosemembran	BioRad	# 10484059
Nonidet [™] P 40 (NP-40)	AppliChem	# A1694
Proteaseinhibitor	Roche	#04693124001
Proteinassay-Kit: Reagenz A, B, S	BioRad	# 5000113 - 5
Proteinleiter	Thermo Scientific	# 26619
PVDF-Membran	BioRad	# 162-0177

SDS	Serva Electrophoresis	# 20765
SDS-Lösung	Applichem	# A0675
TEMED	Sigma Aldrich	# T7024
TRIS	AppliChem	# A2756
Tween [®] 20	AppliChem	# A7564
Electrophoresis Power Supply 600	Pharmacia	
ImageQuant™ LAS4000	GE	
Universal Microplate Reader ELx800UV	BioTech Instruments	

2.1.4. Transfektionen und Luciferase-Reporterassay

Materialien und Geräte	Hersteller	Katalognr.
LIA-Platten 96 Well	Greiner bio-one	# 655073
Lipofectamin [®] LTX Reagenz	invitrogen	# 15338
Luciferase-Assayreagenz	Promega	# E1483
Luciferase-Lysisreagenz	Promega	# E153A
VIKTOR™ X3 Multilabel Reader	PerkinElmer	

Plasmide	Hersteller/Herkunft
Plasmid 27986 (9kB VEGF-Luciferase)	Addgene
Plasmid 21103 (PBS/pU6-HIF-1α RNAi plasmid 1)	
Plasmid 21104 (PBS/pU6-HIF-1α RNAi plasmid 2)	
Plasmid 26731 (HRE-Luciferase)	
pEF (Kontrollvektor)	Dr. J. Alam (Alton Ochsner
Dominant negatives Nrf2 (DN Nrf)	Medical Foundation)

2.1.5. VEGF-ELISA

Materialien und Geräte	Hersteller	Katalognr.
Immunoplatten 96 Well	Thermo Scientific	# 442404
Schwefelsäure	Merck	# 1.00731
TMB Substratreagenz	BioLegend	# 421101
VEGF-Mouse-ELISA-Kit	R&D Systems	# DY493

2.1.6. Laktatassay

Materialien und Geräte	Hersteller	Katalognr.
Filtersäulen	Millipore	# UFC501096
Laktatassaykit	Sigma Aldrich	# MAK064

2.1.7. Analyseprogramme

BioRad CFX-Manager 3.1
GraphPad Prism 5.0
ImageQuantTL
KCJunior
NanoDrop 2000

2.2. Methoden

(Markennamen sind im Fortfolgenden nicht mehr als solche gekennzeichnet.)

2.2.1. Mäuse

Männliche transgene Mäuse mit der humanen G93A-Mutation B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J im SOD1-Gen und weibliche B6SJL-F1 Wildtypmäuse stammten von Jackson Laboratories. Für die Experimente wurden Wildtypen und transgene Tiere, die aus der Verpaarung entstanden, im Stadium P0-P2 verwendet. Die Genehmigung der Tierversuche wurde von der Tierschutzbehörde des Regierungspräsidiums Tübingen, Reg. z.117 erteilt.

2.2.2. Zellkultur

Sämtliche Zellkultivierungen erfolgten im Brutschrank bei 37°C und unter 5% CO₂-Sättigung. Die Zentrifugationseinstellungen betrugen 300 rpm für fünf Minuten, sofern nicht anders vermerkt. Da sich für DEF größtenteils nur angedeutete Tendenzen ergaben und DEF anders als DMF und MMF weder pharmakologisch eingesetzt wird noch als Zwischenprodukt im Körper erscheint, wurden im Verlauf Versuche mit DEF eingestellt und die Priorität auf die weitere Untersuchung von DMF und MMF gelegt.

2.2.2.1. OLN-93

Substanzzusammensetzungen

OLN-93-Lagerungsmedium:	DMEM ohne Phenolrot; 30% FCS; 1% P/S; 5% DMSO
OLN-93-Auftaumedium:	DMEM ohne Phenolrot; 30% FCS; 1% P/S
Kultivierungsmedium:	DMEM ohne Phenolrot; 10% FCS; 1% P/S;
	1% GlutaMAX
Stimulationsmedium:	DMEM ohne Phenolrot; 1% P/S; 1% GlutaMAX

Kultivierung und Aussaat der OLN-93

Die Zelllinie OLN-93 wurde von Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg (Oldenburg) zur Verfügung gestellt und in OLN-93-Lagerungsmedium im Stickstofftank eingefroren. Bei Gebrauch wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen, zur Kultivierung in OLN-93-Auftaumedium in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und nach etwa 24 Stunden im Brutschrank einem Mediumwechsel mit Kultivierungsmedium unterzogen. Nach zwei bis vier Tagen wurden die Zellen gesplittet und in neue 75 cm²-Zellkulturflaschen passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS (-) gewaschen und mit 0,25% Trypsin/EDTA von der Flaschenoberfläche gelöst. Durch Zusetzen des Kultivierungsmediums wurde der Verdau gestoppt und die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert und je 1/10 der Zellsuspension in neue 75 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Nach etwa drei Tagen im Brutschrank stellte sich der OLN-93-Rasen mikroskopisch wieder dicht bewachsen dar, sodass die Zellen auf Platten ausgesät werden konnten.

Für die Aussaat wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, mit 0,25% Trypsin/EDTA vom Untergrund gelöst, der Verdau mit Kultivierungsmedium unterbrochen das Zellpellet nach Abzentrifugation und in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde aus der Zellsuspension entnommen und für weitere Versuche in eine 75 cm²-Zellkulturflasche passagiert. Mittels Neubauer-Zählkammer und Tryptanblau wurde die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt und je nach Versuch 60x10⁴ Zellen pro Well in 6-Well-Platten bzw. 5-20x10⁴ Zellen pro Well in 24-Well-Platten in Kultivierungsmedium ausgesät. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank gelagert und die Zellen am darauffolgenden Tag stimuliert.

Herstellung der Fumarsäureester

Vor jeder Behandlung wurden Lösungen der FAE frisch hergestellt. Die Herstellung einer Lösung von DEF erfolgte durch Verdünnung in 1x PBS. DMF wurde im Verhältnis 1:1 in 1x PBS und DMSO gelöst und im Heizblock zwecks besserer Löslichkeit von DMF erwärmt. MMF wurde in DMSO gelöst und im Verhältnis 7:3 mit 1x PBS verdünnt.

Stimulation der OLN-93-Zellinie

Vor der Stimulation wurde die Wachstumsdichte über das Mikroskop beurteilt. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit Stimulationsmedium versorgt. Pro Well wurden die jeweiligen Lösungen der FAE zugesetzt, sodass die Zellen einer Stoffmengenkonzentration von 30 µM ausgesetzt waren. Neben einer Kontrollgruppe, die keine Stimulation erhielt und später als Normierung für DEF verwendet wurde, wurde für jedes Experiment eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. DMSO musste als Detergenz eingesetzt werden, um DMF und MMF in Lösung zu bringen, wobei es in einer Konzentration von 0,05% bei DMF-Behandlung und 0,03% bei MMF-Behandlung eingebracht wurde. Die Stimulation der DMSO-Kontrollen erfolgte daher je nach Experiment mit 0,05% bzw. 0,03% DMSO. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für drei, sechs oder achtzehn Stunden.

2.2.2.2. Oligodendrozytenvorläuferzellen/OPCs

Substanzzusammensetzungen

50x TAE-Puffer:	2M Tris; 1M Essigsäure (eiskalt); 0,05M EDTA; (pH 8,0)
OL-Medium:	DMEM incl. Phenolrot; 1% 100x OL-Supplement; 2% B27-
	Supplement; 0,5% FCS; 50 ng/ml CNTF; 0,05 mg/ml Holo-
	Transferrin; 5 μg/ml Insulin; 1% GlutaMAX; 0,03 μg/ml L-
	Thyroxin
OPC-Papainlösung:	DMEM incl. Phenolrot; 1,54 mg/ml Papainlösung;
	360 μg/ml L-Cystein; 60 μg/ml DNase I
Präparationsmedium:	DMEM incl. Phenolrot; 1% P/S; 10% FCS; 1% GlutaMAX
100x OL-Supplement:	DMEM incl. Phenolrot; 40 µg/ml 3,3'4-Triiod-L-Thyronin;
	0,5 mg/ml Sodiumselenit; 6 μg/ml Progesteron;
	10,2 mg/ml BSA; 1,61 mg/ml Putreascin
Poly-L-Lysin:	0,1 mg/ml in Wasser

Präparation der Mäusegehirne

Für die Präparation der Mäusegehirne richteten wir uns nach dem Protokoll von O'Meara et al. (2011). Die primären OPCs wurden aus neugeborenen P0-P2 Mäusebabys gewonnen. Nach der Tötung wurden neben einer Entfernung der Schwanzspitze zur Genotypisierung die Mäusegehirne freipräpariert, die Bulbi olfactorii und das Cerebellum entfernt und die Meningen abgezogen. Nach einem dreiminütigen Bad bei 37°C in Präparationsmedium wurden die Mäusegehirne durch Pipettieren grob zerkleinert und mit 20% vorgewärmtem OPC-Papain zum Zweck des Gewebsverdaus versetzt. Das Gemisch wurde für zwanzig Minuten unter ständiger Bewegung bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der Verdau wurde durch Zusetzen von Präparationsmedium abgepuffert und für weitere zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Homogenisierung des Gehirns mittels Pasteurpipetten wurde zusätzliches Präparationsmedium zugesetzt, die Zellen abzentrifugiert und in frischem Präparationsmedium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung der Zellen erfolgte die Aussaat in Präparationsmedium in 25 cm²-Zellkulturflaschen, die im Vorfeld zum Zweck der Zelladhäsion für zwei Stunden mit PLL beschichtet und anschließend mit Wasser und DPBS (-) gewaschen worden bis vierstündiger Inkubation wurde ein kompletter waren. Nach drei-Mediumwechsel mit Präparationsmedium vollzogen und die Zellen dann bis zur OPCs dauerhaft im Brutschrank untergebracht. Isolation der Weitere Medienwechsel erfolgten am dritten und sechsten Tag nach Präparation: hierbei wurden 2/3 des Mediums entfernt und mit Präparationsmedium mit 5 µg/ml Insulin ersetzt.

Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäusebabys wurden nach der Tötung die Schwanzspitzen abgesetzt. Mittels Zugabe von QuickExtrakt wurde DNA durch Erhitzen im Thermoblock auf 65°C für sechs Minuten und auf 95°C für zwei Minuten aus der Schwanzspitze isoliert. Über eine PCR wurde die DNA unter Zugabe von DreamTaq vervielfältigt, wobei folgende Primer für die Wildtypen und transgenen Tiere verwendet wurden: SOD 113 (hSOD1-sense), SOD 114 (hSOD1-antisense), SOD 43 (Interleukin2-sense) und SOD 42 (Interleukin2-antisense). Zur Vervielfältigung

wurde das Protokoll aus Tabelle 1 verwendet. Die Amplifikate und eine DNA-Leiter wurden gelelektrophoretisch in einem 2,5%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid in TAE-Puffer aufgetrennt und das Ergebnis unter UV-Licht fotografiert.

Schritt		Temperatur	Zeit [sec]
1	Denaturierung	95°C	180
2	Denaturierung	95°C	30
3	Anlagerung	58°C	30
4	Elongation	72°C	50
	30 Zyklen der Schritte 2-4		
5	Elongation	72°C	600
6	Kühlung	4°C	∞

Tabelle 1: Programm der PCR (Polymerasekettenreaktion) zur Amplifikation des mutierten SOD1(G93A)-Gens

Isolierung der OPCs

Am neunten Tag nach Präparation wurden die OPCs von den Astrozyten und den Mikroglia isoliert. Hierzu wurden die Flaschen zunächst leicht beklopft, um den Großteil der Mikroglia vom Astrozytenrasen zu lösen. Der Überstand wurde entfernt und durch neues Präparationsmedium ersetzt. Anschließend wurden die Flaschen kräftig beklopft, um die OPCs und die verbliebenen Mikroglia abzulösen. Der Erfolg der Methode wurde mikroskopisch beurteilt. Der Überstand wurde abgenommen und in einer Petrischale für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, um den Mikroglia Zeit für die Adhäsion am Boden der Schale zu geben. Der Überstand mit den OPCs wurde abgenommen, die enthaltenen Zellen wurden abzentrifugiert und in OL-Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Aussaat von 60x10⁴ Zellen je Well in OL-Medium auf im Vorfeld für eine Stunde mit Laminin beschichteten 6-Well-Platten. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank erfolgte die Stimulation mit den FAE oder für die Analyse der Kulturreinheit die sofortige Lysierung der Zellen in RIPA-Puffer zur Weiterverarbeitung zu Western-Blot-Lysaten, wie in Absatz 2.2.4. beschrieben.

Stimulation der primären OPCs mit FAE

Das alte Medium wurde abgenommen und die Zellen mit Stimulationsmedium versorgt. Die Stimulation erfolgte mit einer Stoffmengenkonzentration der FAE von 30 μ M, da diese Menge in der Literatur wiederholt als wirkungsvoll beschrieben wurde (Linker *et al.*, 2011; Scannevin *et al.*, 2012; Wiesner *et al.*, 2013). Für jedes

Experiment wurden Kontrollgruppen ohne Stimulation zur Normierung von DEF und DMSO-Kontrollen mit einer Stoffmengenkonzentration von 0,05% zur Normierung von DMF und MMF mitgeführt. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für drei, sechs oder achtzehn Stunden.

2.2.3. qPCR

(Die Puffer RW1-, RPE- und RDD-Puffer stammen von Qiagen. Weder die Zusammensetzung noch die Bedeutung der Abkürzung ist bekannt.)

Während der Experimente gingen die cDNA-Proben der sechsstündigen DEF-Stimulation in Wildtyp- und mSOD1(G93A)-OPCs zur Neige, sodass hier keine Ergebnisse für die mRNA-Expression der Gene PDHA, Nrf2 und NQO1 vorliegen.

Weiterverarbeitung für die qPCR

Das Medium wurde nach der Inkubationszeit abgenommen und die Zellen in RLT-Puffer (aus dem RNeasy-Kit) mit 2% 2M DTT lysiert. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -80°C.

RNA-Aufreinigung mit dem RNeasy Mini-Kit bzw. RNeasy Micro-Kit

Die Zelllysate der OLN-93-Zellen sowie die Lysate von n=1 des Experiments mit OPCs wurden mit dem RNeasy Mini-Kit aufgereinigt. Da die Ausbeute an RNA mit dem Mini-Kit bei OPCs sehr gering ausfiel, wurde für den zweiten und dritten Versuch mit OPCs das RNeasy Micro-Kit verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 13000 rpm durchgeführt. Die Proben wurden durch zweiminütige Zentrifugation durch den Zellschredder aufgeschlossen und der Durchfluss mit 70% Ethanol gemischt. Das weitere Prozedere orientierte sich an der Anleitung von Qiagen zur Nutzung des RNeasy Mini- und Micro-Kits. Die mRNA wurde über RNAbindende Säulen herausfiltriert und Verunreinigungen über Durchzentrifugation von RW1- und RPE-Puffer herausgewaschen. Bei der Anwendung des Micro-Kits erfolgte zudem ein DNA-Verdau mittels DNase I und RDD-Puffer. Mit RNase-freiem Wasser wurde die mRNA über Zentrifugation aus der Säule gelöst und der Durchfluss bei -80°C gelagert.

mRNA-Konzentrationsbestimmung und Umschreiben in cDNA

Jede Probe wurde mithilfe des NanoDrop2000 auf seine Konzentration an mRNA untersucht. Aus den Proben wurden Gemische mit gleicher Konzentration an mRNA hergestellt und diese mit 20% iScript-Pufferlösung und 5% reverser Transkriptase versetzt. Die enthaltene mRNA wurde mittels Thermocycler in cDNA umgeschrieben (Protokoll der RT-PCR: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 95°C). Ein Teil des Volumens jeder Probe wurde entnommen und gemischt, um eine Standardreihe (10 ng/µl; 2 ng/µl; 0,4 ng/µl; 0,08 ng/µl; 0,016 ng/µl) herzustellen. Das restliche Volumen wurde mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl cDNA verdünnt.

cDNA-Konzentrationsbestimmung via qPCR

Pro Well wurden 5 μl cDNA-Probe, 7 μl SYBR-Green und 0,5 μl eines Primerpaarmixes aus einer 1:10-Verdünnung des Originalprimers und 1,5 μl RNase-freies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 μl pipettiert. Mithilfe des Thermal Cycler CFX96 Real-Time Systems wurde die cDNA nach dem Prinzip der PCR vervielfältigt und die Quantität der cDNA und somit der von den Zellen produzierten mRNA folgender Gene berechnet: VEGF, Glut-1, Ldha, PDHA, HO-1, NQO1, Nrf2, MCT-1. Als Kontrollgene wurden β-Actin, HPRT und Pol2 untersucht und für die Normierung verwendet. Das Protokoll zur Vervielfältigung der cDNA setzte sich aus drei Minuten bei 95°C und 40 Rotationen à 15 Sekunden zwischen 95°C und 60°C zusammen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem BioRad CFX-Manager 3.1.

2.2.4. Western Blot

Substanzzusammensetzungen

RIPA-Puffer:	150 mM Natriumchlorid; 50 mM Tris (pH 7-8); 1 % NP-40;
	0,5 % Natriumdeoxycholat; 0,1 % SDS
Trenngel (12%):	33,5% Wasser; 25% Trenngelpuffer; 0,5% SDS-Lösung;
	40% Acrylamid-Lösung; 1% APS; 0,06% TEMED
Trenngel (8%):	46,5% Wasser; 25% Trenngelpuffer; 0,5% SDS-Lösung;
	27% Acrylamid-Lösung; 1% APS; 0,06% TEMED
Sammelgel (4%):	61% Wasser; 25% Sammelgelpuffer; 0,5% SDS-Lösung;
	13% Acrylamid-Lösung; 0,5% APS; 0,1% TEMED

6x Laemmli-Puffer:	0.375 M Tris/HCI (pH 6.8); 12 % SDS; 30 % Glycerol;
	0.012 % Bromphenolblau
	+ 30 % β-Mercaptoethanol
Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; (pH 8,4)
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl; 0,4 % SDS; (pH 8,8)
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl; 0,4 % SDS; (pH 6,8)
10x Transferpuffer:	25 mM Tris; 0,192 M Glycin; (pH 8,3-8,4)
10x PBS (pH 7,4):	8% Natriumchlorid; 1,44% Dinatriumhydrogenphosphat;
	0,2% Kaliumchlorid; 0,2% Kaliumdihydrogenphosphat
PBST:	1x PBS; 0,05% Tween 20

Weiterverarbeitung für den Western Blot

Das Medium wurde nach der Inkubationszeit abgenommen und die Zellen mit 60 µl RIPA-Puffer incl. 1x Proteaseinhibitor lysiert. Die Lysate wurden bei 13000 rpm für fünf Minuten in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert.

Proteinquantifizierung

5 µl jeder Probe sowie eine BSA-Standardreihe in RIPA-Puffer (0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 1,5 mg/ml) wurden mithilfe eines Proteinassays aus 23 µl Reagenz A, 0,5 µl Reagenz S und 200 µl Reagenz B auf die Gesamtmenge an Protein untersucht. Die Farbintensitäten jeder Probe wurde photometrisch mit dem Universal Microplate Reader ELx800UV bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen und aus den Daten ein Probenvolumen mit gleicher Proteinmenge berechnet. Die Gemische wurden im Verhältnis 6:1 mit 6x Laemmli-Puffer versetzt und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Herstellung der Gele

Hierfür wurden die Glasplatten in die dafür vorgesehenen Halterungen gespannt. Erst wurde das Trenngel nach oben beschriebenem Rezept zusammengemischt und in den Spalt der Gelplatten gefüllt. Aufgrund der unterschiedlichen Proteingrößen wurden für die Beurteilung des HIF-1α- und Nrf2-Verhaltens die 12%-igen Trenngele und für die Beurteilung des Verhaltens von NG2 die 8%-igen
Trenngele verwendet. Zum Erhalt einer sauberen Gellinie wurde Isopropanol über die Trenngelfront pipettiert. Nach der Aushärtung wurde das Isopropanol entfernt und die Platten bis zur Obergrenze mit dem 4%-Sammelgel aufgefüllt. Die Kämme wurden in das noch flüssige Sammelgel gesteckt und bis zur Polymerisierung des Gels belassen.

Western Blot

Das Prozedere des Western Blots entsprach der gängigen Vorgehensweise. Hierfür wurden die SDS-Gelplatten in die mit Laufpuffer befüllte Western-Blot-Kammer eingespannt und die Kämme aus den Gelen gezogen. Die Taschen wurden mittels Pipettieren gespült und je nach Experiment mit 4,5-25 µg Protein bzw. einer Proteinleiter beladen. Der Einlauf der Proben in die Gele erfolgte bei 50 V für fünfzehn Minuten, die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 V. Das Blotting der Versuche von HIF-1α bzw. Nrf2 wurde bei 200 mA für 105 Minuten auf Nitrozellulosemembranen in Transferpuffer vollzogen. Die Proteine der NG2-Versuche wurden aufgrund der Proteingröße für 17 Stunden bei 175 mA in Transferpuffer mit zusätzlich 0,05% SDS auf PVDF-Membranen, die vorher in Methanol aktiviert worden waren, geblottet. Bei den PVDF-Membranen wurde direkt anschließend der Proteintransfer auf die Membran über eine Proteinfärbung sichtbar gemacht. Die Färbung erfolgte über die Inkubation der PVDF-Membran mit dem Senisitizer aus dem genannten Kit für zehn Minuten und nachfolgend der Proteinfärbelösung für fünfzehn Minuten. Durch kurze Waschschritte mit entsalztem Wasser wurden die Färbereste abgespült und die Membran mit dem ImageQuant LAS4000 fotografiert. Die Membran wurde über das Destain-Reagenz aus dem Kit wieder entfärbt. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurden die Nitrozellulose- und die PVDF-Membranen für eine Stunde mit 3% BSA in PBS bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung geblockt.

Inkubation der Antikörper

Die Erstantikörper wurden in PBST, 1% BSA und 0,005% Natriumazid in einer Verdünnung von 1:2000 bei HIF-1α, 1:200 bei Nrf2, 1:5000 bei β-Actin und 1:300 bei NG2 angesetzt. Für die Herstellung der Zweitantikörper (goat-anti-rabbit; goat-anti-mouse) wurde 2,5% Milchpulver als Blocksubstanz in PBST gelöst und der Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 zugesetzt. Die Inkubation der

Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei Waschschritten à zehn Minuten in 1x PBST wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper inkubiert und weitere drei Mal für zehn Minuten mit 1x PBST gewaschen. Die Membran wurde unter Zuhilfenahme von ECL-Substrat über die Messung der Chemolumineszenz mit dem ImageQuant LAS4000 entwickelt und die Bandenstärke mit der entsprechenden Software quantifiziert. Als Normierungsprotein für HIF-1 α und Nrf2 wurde β -Actin verwendet, als Ladekontrolle für NG2 diente die Proteinanfärbung.

2.2.5. Transfektionen und Luciferase-Reporterassay

Kultivierung, Aussaat und Transfektion der OLN-93

Die Kultivierung und Aussaat der OLN-93 in Kultivierungsmedium erfolgte in 24-Well-Platten in einer Anzahl von 5-20x10⁴ Zellen pro Well. 24 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen transfiziert. Für die Transfektionen wurden folgende Plasmide verwendet: Plasmid 27986 (9kB VEGF-Luciferase), Plasmid 21103 (PBS/pU6-HIF-1 α RNAi Plasmid 1), Plasmid 21104 (PBS/pU6-HIF-1 α RNAi Plasmid 2), Plasmid 26731 (HRE-Luciferase), pEF (Kontrollvektor) und dominant negatives Nrf (DN Nrf). Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die Transfektion eines Well. 0,5 µg der Plasmid-DNA bei Transfektion bzw. 0,25 µg bei Cotransfektion und 0,5 µl PlusReagenz wurden in 100 µl DMEM ohne Phenolrot gelöst. Nach zehnminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 150 µl Lipofektamin zugesetzt und weitere 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wurde durch 500 µl frisches Kultivierungsmedium ersetzt und mit 100 µl des Plasmidmixes versehen. Die Platte wurde für fünf Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Behandlung der transfizierten Zellen mit FAE

24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium vom Zellrasen abgenommen und Stimulationsmedium zugesetzt. Die Zellen wurden mit 30 µM der FAE bzw. DMSO in gleichwertiger Konzentration stimuliert und für drei, sechs oder achtzehn Stunden bebrütet. Die Zellen wurden mit DPBS (-) gewaschen, mit 1x Luciferase-Lysisreagenz aufgeschlossen und für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung des Überstands erfolgte bei -80°C.

<u>Luciferaseassay</u>

Nach Durchführung eines Proteinassays mit einer BSA-Standardreihe in Lysisreagenz (0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 1,5 mg/ml) zur späteren Normierung, wurde die Luciferaseaktivität der Lysate bestimmt. Hierzu wurden die Lysate im Verhältnis 1:1 mit Luciferase-Assayreagenz in LIA-Platten gemischt und die Lichtemission mit dem Multilabel Reader PerkinElmer VIKTOR X3 gemessen.

2.2.6. VEGF-ELISA

Nach abgeschlossener Behandlung mit den FAE wurden die Zellüberstände gesammelt und bei -80°C gelagert. Die Quantifizierung der produzierten VEGF-Menge nach FAE-Stimulation wurde mit dem VEGF-Mouse-ELISA-Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zwischen jedem unten beschriebenen Einzelschritt wurde jeweils vier Mal mit PBST gewaschen, die Inkubation erfolgte jeweils bei Raumtemperatur sofern nicht anders vermerkt. Die Immunoplatten wurden über Nacht mit dem Capture-Antikörper in PBS bei Raumtemperatur inkubiert und am Folgetag für eine Stunde mit 1% BSA in PBS geblockt. Die Proben und die VEGF-Standardreihe (1000 pg/ml; 500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62,5 pg/ml; 31,25 pg/ml; 15,6 pg/ml; 0 pg/ml) wurden pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Wells wurden mit dem Detektionsantikörper in 1% BSA/PBS für eine Stunde versetzt und die Platte anschließend mit Avidin-HRP-Lösung in 1% BSA/PBS für zwanzig Minuten inkubiert. Es wurde TMB-Substratlösung in einem 1:1-Verhältnis der Reagenzien A und B hinzugefügt und für fünfzehn Minuten in Dunkelheit inkubiert. Nach Hinzufügen von 2M Schwefelsäure zum TMB-Substrat wurde die VEGF-Konzentration mittels des Universal Microplate Readers ELx800UV bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und auf die absolute Proteinmenge der Zellen normiert, die wie oben beschrieben mit Proteinassays errechnet wurde.

2.2.7. Laktatassay

Die Überstände wurden nach der FAE-Stimulation gesammelt und durch Zentrifugation bei 13000 rpm für zehn Minuten über Filtersäulen aufgereinigt. Die Quantifizierung der Laktatmenge in den Überständen erfolgte über die Durchführung eines Laktatassays nach Angaben des Herstellers: neben einer Laktatstandardreihe (0 nmol/Well; 2 nmol/Well; 4 nmol/Well; 6 nmol/Well; 8 nmol/Well 10 nmol/Well) wurden von den OLN-93-Überständen 10 µl mit zusätzlich 40 µl Laktatassaypuffer bzw. 50 µl von den Überständen der Primärkultur in eine Mikrotestplatte pipettiert und 50 µl eines Mastermixes aus 96% Laktatassaypuffer, 4% Laktatenzymmix und 4% Laktatprobe hinzugefügt. Nach Inkubation in Dunkelheit für 30 Minuten wurde die Farbintensität über den Universal Microplate Reader ELx800UV bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

2.2.8. Statistische Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA mit Graph Pad Prism 5.0. */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, **/p < 0.01, ***/p < 0.001 und ****/p < 0.0001 wurden als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die Anzahl der unabhängig durchgeführten Versuche *n* ist jeweils in der Bildunterschrift genannt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Reinheit der Primärkulturen

Da die OPCs, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aus Mischkulturen entstanden, wurde im ersten Schritt überprüft, ob die Kulturen einen ausreichenden Reinheitsgrad mit wenig Verunreinigung an Astrozyten und Mikroglia aufwiesen. Die Überprüfung der Verunreinigung der OPC-Primärkulturen mit Astrozyten über GFAP als Astrozytenmarker und Mikroglia über Iba1 als Mikrogliamarker im Western Blot wurden in einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe überprüft und sind daher hier nicht dargestellt (Sprissler, 2016). Der Nachweis von GFAP- und Iba1-Protein in OPC-Kulturen ergab eine spärliche Verunreinigung mit Astrozyten und Mikroglia. Die Darstellung des NG2-Proteins in OPC-Lysaten ergab ein positives Signal bei rund 270 kDa, wie in der Produktinformation des verwendeten NG2-Antikörpers angegeben. *Abbildung 2* stellt exemplarisch einen der durchgeführten Western Blots dar. In der Zusammenschau stuften wir die Reinheit der OPC-Primärkulturen ausgehend von O'Mearas Protokoll von 2011 daher als ausreichend rein ein und führten die folgenden Versuche mit der darin beschriebenen Vorgehensweise durch.



Abb. 2 Darstellung der Proteinmenge von NG2 (neurales/gliales Antigen 2) in Lysaten aus Primärkulturen von Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs). A stellt exemplarisch einen Western-Blot zur Proteindetektion von NG2 in Lysaten aus primären OPC-Kulturen dar, B veranschaulicht die zur Normierung verwendete Proteinfärbung der entsprechenden Membran. Linie 1 veranschaulicht die Proteinleiter, Linie 6 besteht aus OPC-Lysat und zeigt eine deutliche Bande bei etwa 270 kDa. Die Linien 2 - 5 enthalten von links nach rechts Lysate aus Mäuserückenmark, Astrozytenkulturen, Mikrogliakulturen und Neuronenkulturen und sind für diese Arbeit nebensächlich. Das Ergebnis wurde mit *n*=8 unabhängig durchgeführten Versuchen bestätigt.

3.2. Einfluss von FAE auf die Nrf2-Signalkaskade

3.2.1. Nrf2-Zielgeninduktion durch FAE in OLN-93 und Wildtyp-OPCs

FAE induzieren den Transkriptionsfaktor Nrf2 in diversen Zellen. Um festzustellen, ob FAE auch in Oligodendrozyten einen Einfluss auf den über Nrf2 kontrollierten Signalweg ausübt, wurden zuerst verschiedene Zielgene mittels qPCR in OLN-93-Zellen untersucht und dabei zwischen DEF-, DMF- und MMF-Stimulation unterschieden. Das gleiche Vorgehen wurde zur Untersuchung der Vorgänge in primären Wildtyp-OPCs angewendet. Als Nrf2-Zielgene wurden die Hämoxygenase 1 (HO-1) sowie NQO1 (NAD(P)H-Dehydrogenase, Quinone 1) verwendet. Die Expression von NQO1 konnte nur in primären Oligodendrozyten untersucht werden, da sich die murinen Primersequenzen als nicht komplementär zur mRNA von NQO1 aus der Rattenzelllinie OLN-93 erwiesen. Weiterhin wurden die mRNA-Level von Nrf2 selbst nach FAE-Stimulation bestimmt.

OLN-93 reagieren auf DMF mit einer signifikanten Nrf2-Überexpression (*Abb. 3A*). MMF und DEF haben zu den untersuchten Zeitpunkten keinen Einfluss auf die Nrf2-Expression. Die Erhöhung der mRNA-Spiegel der HO-1 (*Abb. 3B*) auf bis zu 1400% des Kontrollwertes zeigt ein sehr sensibles Ansprechen von OLN-93 auf FAE, wobei DEF und DMF zu allen drei untersuchten Zeitpunkten und MMF nach sechs Stunden signifikante Ergebnisse zeigen. Während DEF und DMF immense Steigerungen erbringen, bewirkt MMF nur einen moderaten Anstieg der mRNA der HO-1. Die Auswirkungen auf HO-1 zeigen sich bereits zu einem Zeitpunkt, an dem die Überexpression von Nrf2 noch nicht begonnen hat.



Abb. 3 Expression von Nrf2 (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like 2) und dessen Zielgen HO-1 (Hämoxygenase 1) nach Fumaratstimulation in der Zelllinie OLN-93. Darstellung der mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level von Nrf2 (A) und HO-1 (B) in OLN-93 nach Behandlung mit 30 μ M Diethylfumarat (DEF; grün) bezogen auf unbehandelte Kontrollen (weiß) bzw. 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau) oder Monomethylfumarat (MMF; rot) bezogen auf Kontrollen mit Dimethylsulfoxid (DMSO; grau). Die Stimulation erfolgte in einer Zeitreihe aus drei, sechs und achtzehn Stunden und wurde mittels qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) quantifiziert. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, **/p < 0.01, ***/p < 0.001 und ****/p < 0.001 wurden als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=6-9.

Die Untersuchung von Nrf2 und dessen Zielgenen in Wildtyp-OPCs nach FAE-Stimulation (*Abb. 4A*) mittels qPCR erbringt eine Reaktion auf DMF sowie im Unterschied zu den Ergebnissen in OLN-93 auch auf MMF. Dabei reagieren Wildtyp-OPCs am sensitivsten auf MMF. Die Quantifizierung der Effekte auf HO-1 (*Abb. 4B*) ergibt eine Überexpression nach DMF-Stimulation ohne signifikante Transkriptionssteigerungen durch DEF und MMF. Im direkten Vergleich der OLN-93 und der Wildtyp-OPCs ist die Steigerung der HO-1-Expression in OPCs eher von gemäßigtem Charakter, wohingegen OLN-93 mit zum Teil extremen Effekten reagieren. Die Transkription von NQO1 (*Abb. 4C*) lässt sich in Wildtyp-OPCs nur durch MMF steigern. Hier fällt ein höchstsignifikanter Anstieg um das 200-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ins Auge.



Abb. 4 Expression von Nrf2 (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like 2) und den Nrf2-Zielgenen HO-1 (Hämoxygenase 1) und NQO1 (NAD(P)H-Quinone-Oxidoreduktase 1) nach Stimulation mit Fumarsäureestern in primären Wildtyp-OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen). Darstellung der über qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) ermittelten mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level von Nrf2 (A), HO-1 (B) und NQO1 (C) in primären OPCs aus Wildtypmäusen nach Behandlung mit 30 µM Diethylfumarat (DEF; grün) bezogen auf unbehandelte Kontrollen (weiß) bzw. 30 µM Dimethylfumarat (DMF; blau) oder Monomethylfumarat (MMF; rot) bezogen auf Kontrollen mit Dimethylsulfoxid (DMSO; grau). Die Stimulation erfolgte in einer Zeitreihe aus drei, sechs und achtzehn Stunden. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, **/p < 0.01 und ***/p < 0.001 wurden als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=6-9 (n=2-3 für DEF und den Zeitpunkt 3h).

Bei allen drei untersuchten mRNAs tritt die signifikante Expressionssteigerung in Wildtyp-OPCs bereits zu den frühen Zeitpunkten auf und flaut spätestens zum achtzehnstündigen Zeitpunkt wieder ab.

3.2.2. Verhalten des Nrf2-Proteins nach FAE-Stimulation in Wildtyp-OPCs

Obwohl aus der Literatur bekannt ist, dass es sich bei HO-1 und NQO1 um direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors Nrf2 handelt und dieser durch Fumarat induziert werden kann, ist aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse der erhöhten Expression dieser Proteine noch keine Aussage darüber möglich, dass Nrf2 das entscheidende Verbindungsprotein zwischen Fumarat und der Transkriptionssteigerung der Zielgene ist. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die absolute Proteinmenge von Nrf2 nach FAE-Stimulation untersucht und das Ergebnis mit Kontrollstimulationen verglichen.

Es ergibt sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte und mit keinem der beiden FAE-Derivate eine signifikante Akkumulation von Nrf2 in Wildtyp-OPCs, was gegen eine Induktion von Nrf2 in diesen Zellen spricht (*Abb. 5A und 5B*). *Abbildung 5* stellt das Verhalten von Nrf2 nach Exposition von DMF oder MMF in Wildtyp-OPCs dar.



Abb. 5 Verhalten von Nrf2 (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like 2) nach Stimulation mit Fumarsäureestern in wildtypischen OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen). Quantifizierung der Proteinmenge von Nrf2 mittels Western-Blot-Analyse nach Stimulation von Wildtyp-OPCs mit 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau) bzw. Monomethylfumarat (MMF; rot) oder einer vergleichbaren Menge an Dimethylsulfoxid (DMSO; grau). Die Behandlung wurde für sechs oder achtzehn Stunden vorgenommen und die Ergebnisse von Nrf2 auf die Menge an β -Actin bezogen. Die Rohwerte wurden auf die DMSO-Kontrolle normiert. A stellt exemplarisch einen der durchgeführten Western-Blots nach sechsstündiger MMF-Exposition dar; in B sind die ermittelten Bandenstärken in Diagrammform dargestellt. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=5-12. In der Zusammenschau konnte ein positiver Einfluss von FAE auf die Entfaltung des Nrf2-Signalwegs beschrieben werden, wobei in Wildtyp-OPCs kein Nachweis erbracht werden konnte, dass dies auf eine Proteinakkumulation von Nrf2 zurückzuführen ist.

3.3. Auswirkungen von FAE auf den HIF-1α-Signalweg

3.3.1. HIF-1α-Zielgeninduktion durch FAE in OLN-93 und Wildtyp-OPCs

Neben Nrf2 ist HIF-1 α als weiterer Faktor an der Ausübung der FAE-Effekte beteiligt. Um einen ersten Anhalt zu bekommen, ob dies auch in OLN-93 und OPCs der Fall ist, wurde die potentielle Expressionssteigerung von HIF-1 α -Zielgenen nach FAE-Gabe in OLN-93 und primären Wildtyp-OPCs untersucht. HIF-1 α ist ein direkter Transkriptionsstimulus für den Glukosetransporter Glut-1, den Wachstumsfaktor VEGF und die Laktatdehydrogenase A (Ldha). Zusätzlich hat HIF-1 α einen hemmenden Einfluss auf die Transkription der Pyruvatdehydrogenase A (PDHA). Die verwendeten murinen Primersequenzen für die Ldha waren aufgrund von mangelhafter Komplementarität nicht für die Expressionsmessung der Ldha in OLN-93, die aus Rattenzellen erzeugt wurden, geeignet. Deshalb konnte die Untersuchung der Ldha nur in primären OPCs durchgeführt werden.

Untersucht wurden die HIF-1α-Zielgene VEGF (*Abb. 6A*), Glut-1 (*Abb. 6B*) und PDHA (*Abb. 6C*) in OLN-93 nach Durchführung von qPCRs. Es ergibt sich eine moderate Steigerung der Transkription von VEGF nach sechsstündiger Stimulationszeit mit DMF und nach achtzehnstündiger Stimulationszeit mit MMF. Die Transkription von Glut-1 kann ebenfalls durch DEF und DMF vor allem nach achtzehnstündiger Exposition gesteigert werden. Entgegen der Hypothese, dass FAE eine Expressionsminderung der Pyruvatdehydrogenase A nach sich zieht, zeigt sich in OLN-93 eine dezente aber signifikante Überexpression nach sechsstündiger DMF-Stimulation.

Vergleichbar mit den Ergebnissen in OLN-93 kann auch in Wildtyp-OPCs die Expressionen der HIF-1α-Zielgene durch die verschiedenen FAE gesteigert werden. Die mRNA-Spiegel von VEGF (*Abb. 7A*) können in besagten OPCs durch DMF nach achtzehn Stunden angehoben werden, während Stimulationen mit DEF oder MMF keine signifikanten Überexpressionen für VEGF zur Folge haben. Die Untersuchung der mRNA-Menge von Glut-1 (*Abb. 7B*) ergibt ein signifikantes Ansprechen auf DMF nach achtzehnstündiger und auf MMF nach dreistündiger

Stimulation. Untersucht wurden zusätzlich die mRNA-Level der Ldha (*Abb. 7C*), die neben einem signifikanten Ergebnis nach DEF-Stimulation allerdings keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Schließlich wurde auch die Transkriptionsrate der PDHA (*Abb. 7D*) in Wildtyp-OPCs quantifiziert, bei der im Gegensatz zu den Ergebnissen in OLN-93 tatsächlich eine geringere Expression im Vergleich zu Kontrollbehandlungen beobachtet werden kann. Neben tendenziellen Herunterregulationen durch DMF und MMF bewirkt die Exposition durch DEF für achtzehn Stunden einen signifikanten Effekt.



Abb. 6 Expression von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), dem Glukosetransporter Glut-1 und der Pyruvatdehydrogenase A (PDHA) nach Fumarsäureesterstimulation in der Zelllinie OLN-93. Veranschaulichung der mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level von VEGF (A), Glut-1 (B) und PDHA (C) in OLN-93 nach Behandlung mit 30 μ M Diethylfumarat (DEF; grün) bezogen auf unbehandelte Kontrollen (weiß) bzw. 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau) oder Monomethylfumarat (MMF; rot) bezogen auf Kontrollen mit Dimethylsulfoxid (DMSO; grau). Die Quantifizierung der mRNA-Level erfolgte mittels qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion). Für die Darstellung der zeitlichen Entwicklung wurde eine Zeitreihe aus drei, sechs und achtzehn Stunden erstellt. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, **/p < 0.001 und ****/p < 0.0001 wurden als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/-SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=6-9.



Abb. 7 Expression von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), dem Glukosetransporter Glut-1, der Laktatdehydrogenase A (Ldha) und der Pyruvatdehydrogenase A (PDHA) nach Fumarsäureesterstimulation in primären OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen). Darstellung der mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level der Zielgene von HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α) VEGF (A), Glut-1 (B), Ldha (C) und PDHA (D) in Wildtyp-OPCs nach Behandlung mit Diethylfumarat (DEF; grün), Dimethylfumarat (DMF; blau) oder Monomethylfumarat (MMF; rot) für drei, sechs oder achtzehn Stunden. Die Absolutwerte von DEF beziehen sich auf unbehandelte Kontrollen (weiß), die Werte von DMF und MMF sind auf Dimethylsulfoxid-Kontrollen (DMSO; grau) bezogen. Die Datenerhebung wurde mittels qPCR (quantitativer Polymerasekettenreaktion) vorgenommen. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, ** bzw. ##/p < 0.01 und ***/p < 0.001 wurden als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=9 (n=2-3 für DEF und den Zeitpunkt 3h).

Damit kann die Expression aller untersuchten Zielgene (mit Ausnahme der PDHA in Wildtyp-OPCs) sowohl in der Zelllinie als auch in den wildtypischen Oligodendrozytenvorläufern in unterschiedlicher Weise durch DEF, DMF und MMF gesteigert werden.

Das Ausmaß, mit dem der HIF-1α-Signalweg in OPCs aus Wildtypmäusen auf FAE anspricht, ist sehr ähnlich zum Nrf2-Signalweg. Man kann hingegen grob festhalten, dass die Effekte auf den HIF-1α-Signalweg im Vergleich zu denen auf den Nrf2-Signalweg generell eher zu einem späteren Zeitpunkt eintreten. Eine weitere Erkenntnis ist, dass das Einsetzen der maximal zu beobachtenden Wirkung von DMF im Allgemeinen mehr Zeit benötigt als bei MMF. DEF entfaltet in der überwiegenden Mehrheit keine oder nur eine geringe Wirkung auf die einzelnen Gene und wurde daher abgesehen von den qPCR-Experimenten in keinem anderen Versuch weiter untersucht.

3.3.2. Stabilisierung von HIF-1α durch DMF in Wildtyp-OPCs

Zur Überprüfung, ob die Effekte auf die HIF-1α-Zielgene über die Anhäufung von HIF-1α zustande kommen, wurden Western-Blot-Analysen mit Lysaten von Wildtyp-OPCs durchgeführt, die im Vorfeld mit DMF oder MMF behandelt worden waren. Über die Detektion von HIF-1α mittels Antikörpern können wir feststellen, ob sich die Proteinmenge nach FAE-Gabe vervielfältigt.

Die sechsstündige Exposition der Wildtyp-OPCs mit DMF zieht in diesen eine Kumulation von HIF-1 α nach sich. *Abbildung 8A* stellt exemplarisch einen Western Blot dar, aus dem ersichtlich wird, dass die Bandenstärke intensiver und damit die Proteinmenge vermehrt ist, wenn DMF einwirkt. Die Gabe von MMF führt nicht zur signifikanten HIF-1 α -Akkumulation, ebenso wenig wie die längerfristige Gabe von DMF für achtzehn Stunden (*Abb. 8B*).



Abb. 8 Stabilisierung von HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α) durch Dimethylfumarat (DMF) in wildtypischen OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen). Quantifizierung der Proteinmenge von HIF-1 α mittels Western-Blot-Analyse nach Stimulation von Wildtyp-OPCs mit 30 µM Dimethylfumarat (DMF; blau) bzw. Monomethylfumarat (MMF; rot) oder einer vergleichbaren Menge an Dimethylsulfoxid (DMSO; grau). Die Behandlung wurde für sechs oder achtzehn Stunden vorgenommen und die Ergebnisse von HIF-1 α auf die Menge an β -Actin in den Lysaten bezogen. Die Rohwerte wurden auf die DMSO-Kontrolle normiert. A stellt exemplarisch einen der durchgeführten Western-Blots mit Zunahme der Bandenstärke von HIF-1 α nach sechsstündiger DMF-Exposition dar; in B sind die ermittelten Bandenstärken in Diagrammform dargestellt. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=8-12 (n=2-3 für den Zeitpunkt 18h).

3.3.3. VEGF-Überproduktion durch FAE in OLN-93 und Wildtyp-OPCs

Da die FAE-Gabe eine Expressionssteigerung von VEGF zur Folge hat, soll gerade im Hinblick auf die wichtige Rolle von VEGF bei Neurodegeneration untersucht werden, ob sich die gesteigerte Transkription von VEGF in einer tatsächlichen Proteinanhäufung niederschlägt. Folglich wurde die von OLN-93 und Wildtyp-OPCs produzierte VEGF-Menge nach FAE-Exposition mit spezifischen ELISAs aus dem Überstand bestimmt.

DMF hebt sowohl in OLN-93 als auch in OPCs aus Wildtypmäusen die Menge an VEGF im Überstand der Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant an (*Abb. 9A* und *9B*). MMF verursacht trotz angedeuteter Steigerung in OLN-93-Zellen keine signifikanten Effekte. Damit ist der Schluss möglich, dass DMF nicht nur transkriptionell auf die Expression von VEGF einwirkt, sondern auch die Proteinlevel im Extrazellularraum erhöht.

В



Abb. 9 Steigerung der Produktion von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) in der Zelllinie OLN-93 und Wildtyp-OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen) durch Dimethylfumarat. Darstellung der relativen VEGF-Menge im Überstand von OLN-93 (A) und OPCs aus Wildtyptieren (B) nach vorheriger Gabe von 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau), 30 μ M Monomethylfumarat (MMF; rot) oder äquivalenten Dosen an Dimethylsulfoxid (DMSO; grau). Methodisch wurden hierfür VEGF-ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assays) durchgeführt und die Werte auf die absolute Proteinmenge und die DMSO-Kontrollen normiert. OLN-93 zeigten das dargestellte Ergebnis nach sechs Stunden, die Wildtyp-OPCs nach achtzehn Stunden. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=7-9.

3.4. Vermittlung der FAE-Effekte in OLN-93 über Nrf2 und HIF-1α

Zur Klärung der Frage, ob die Effekte von FAE in OLN-93 auf Nrf2 zurückzuführen sind, wurden mit OLN-93-Zellen Reporterassays durchgeführt. Über Transfektionen von OLN-93 mit einem VEGF-Luciferaseplasmid, dass neben dem VEGF-Gen mit zugehörigem Promotor eine nachgeschaltete Sequenz des Luciferasegens trägt, können durch Aktivitätsmessung der Luciferase indirekt Schlüsse gezogen werden, wie stark der Promotor von beeinflussenden Faktoren wie zum Beispiel Nrf2 aktiviert wird. Für die nähere Analyse, ob tatsächlich Nrf2 an diesem Promotor angreift und dessen Transkription mit samt des Luciferasegens initiiert, wurde parallel zum VEGF-Luciferaseplasmid zusätzlich eine dominant-negative Form von Nrf (DN Nrf), die einen Knock-out von Nrf2 in den Zellen verursacht, beziehungsweise ein funktionsloser Leervektor transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit DMF, MMF oder DMSO stimuliert und die Luciferaseaktivitäten untereinander verglichen. Aus der *Abbildung 10A* ist zu entnehmen, dass sowohl DMF als auch MMF nach Transfektion der OLN-93 mit dem VEGF-Luciferaseplasmid und dem Leervektor im

Vergleich zur Kontrolle signifikante Effekte in Form einer Aktivitätssteigerung der Luciferase und damit des Promotors entfalten können. Umgekehrt tritt trotz FAE-Gabe diese Aktivitätssteigerung nicht auf, wenn über Cotransfektion mit DN Nrf die Funktionalität von Nrf2 behindert ist. In diesem Fall bleiben die Werte auf dem Ausgangsniveau.



Abb. 10 Verhalten der Luciferaseaktivität durch Fumarsäureester nach Cotransfektion mit dominant-negativem Nrf (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like) (DN Nrf). Nach Cotransfektion der Zelllinie OLN-93 mit VEGF(vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)-Luciferaseplasmiden und einer dominant-negativen Form von Nrf, die einen Knock-down von Nrf2 erzeugt, wurden die Zellen mit 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau), 30 μ M Monomethylfumarat (MMF; rot) oder entsprechenden Mengen an Dimethylsulfoxid (DMSO; grau) über sechs Stunden stimuliert. Die Ergebnisse der Luciferaseaktivität sind nach Normierung auf die DMSO-Kontrollen und die absolute Proteinmenge dargestellt (A). Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). ***/p < 0.001 wurde als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, *n*=12-15.

Zur Untermauerung der Aussage, dass die Effekte von FAE auf die Expression der verschiedenen HIF-1α-Zielgene auf HIF-1α zurückzuführen sind, wurden erneut Transfektionen der Zelllinie durchgeführt. Dabei kam wieder das VEGF-Luciferaseplasmid zum Einsatz. Neben einer Anbindungsstelle für Nrf2 ist es ebenso ein Angriffspunkt für HIF-1α und kann darüber in seiner Transkriptionsrate gesteigert werden. Im ersten Schritt wurden diese Plasmide entweder mit zwei

verschiedenen shRNAs, die gegen HIF-1α gerichtet sind, oder mit funktionslosen Leervektoren in die Zellen eingebracht. Nach der Stimulation mit FAE erfolgte die Aktivitätsmessung der Luciferase, über deren Höhe ein Rückschluss auf die vorhergehende Promotorstimulation gezogen werden kann. Die shRNAs binden spezifisch an die mRNA von HIF-1α und bauen diese dadurch ab, was einem HIF-1α-Knock-down gleichkommt.

Die Wirkung von DMF und MMF unter Knock-out-Bedingungen von HIF-1α im Vergleich zur Cotransfektion mit einem Leervektor fällt signifikant geringer aus, sodass sich Werte ergeben, die sich um das Ausgangsniveau bewegen (*Abb. 11A*). Alles in allem lässt dies die Aussage zu, dass durch die Involvierung von HIF-1α, dieser Faktor durch die shRNAs seine Wirkung in Form der Steigerung der Luciferaseaktivität trotz FAE-Stimulation nicht mehr ausüben kann. Mittels shRNA 1 kristallisieren sich dezent deutlichere Effekte heraus als mit shRNA 2, weshalb im Verlauf Experimente nur noch mit shRNA 1 durchgeführt wurden.





Wir wiederholten den gleichen Versuch noch einmal mit der einzigen Ausnahme, dass wir statt des VEGF-Luciferaseplasmids ein HRE-Luciferaseplasmid benutzten. Der VEGF-Promotor ist ein recht unspezifischer Angriffspunkt für HIF-1α und kann auch von anderen Mediatoren wie z.B. Nrf2 angesteuert werden. Beim HRE-Luciferaseplasmid handelt es sich um ein Plasmid, das anstelle des VEGF-Gens sechs Hypoxie-responsive Elemente (HRE) vor dem Luciferasegen trägt, die in der Literatur als hochspezifisch für die Bindung von HIF-1α, aber nicht für Nrf2 gelten. Tatsächlich kann hier trotz Knock-out der Nrf2-Funktion durch die dominant-negative Nrf-Variante die quantitativ gleichwertige Reaktion durch FAE eingeleitet werden wie bei erhaltener Nrf2-Funktion (*Abb. 12A*). Dies spricht dafür, dass Nrf2 als Transkriptionsfaktor nicht über die Bindung an HREs wirken kann.



Abb. 12 Auswirkung der Stimulation mit Fumarsäureestern auf die Zelllinie OLN-93 nach Cotransfektion mit dominant-negativem Nrf (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like) (DN Nrf). OLN-93 wurden mit HRE(Hypoxie-responsives Element)-Luciferaseplasmiden und mit der dominant-negativen Form von Nrf (DN Nrf) oder Leervektoren cotransfiziert und anschließend für sechs Stunden mit 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau), 30 μ M Monomethylfumarat (MMF; rot) oder vergleichbaren Mengen an Dimethylsulfoxid (DMSO; grau) versetzt. Die Rohwerte der gemessenen Luciferaseaktivität wurden auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen und die absolute Proteinmenge normiert (A). Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, **/p < 0.01 wurde als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=5-6.

Α

Im nächsten Schritt wurden OLN-93 nur mit dem HRE-Luciferaseplasmid transfiziert, welches über die Gegenwart der HRE hochspezifisch auf die Bindung von HIF-1 α reagiert. Die Luciferaseaktivität lässt sich nach sechsstündiger Behandlung mit DMF hochsignifikant steigern, während die Stimulation mit MMF nur eine Tendenz zur Steigerung zeigt (*Abb. 13A*). Bei länger andauernder Stimulation sind die Auswirkungen von DMF nicht mehr vorfindbar. Diese Beobachtung lässt die Aussage zu, dass das von FAE eingeleitete Signal in der Tat über HIF-1 α induziert wird.



Abb. 13 Steigerung der HRE(Hypoxie-responsives Element)-Promotoraktivität durch Fumarsäureestergabe in der Zelllinie OLN-93. Darstellung der Steigerung der Luciferaseaktivität nach sechsstündiger Stimulation mit 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau) bzw. Monomethylfumarat (MMF; rot) nach vorhergegangener Transfektion mit für HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α)-spezifischen HRE-Luciferaseplasmiden (A). Die Werte sind auf entsprechende Kontrollen mit Dimethylsulfoxid (DMSO; grau) und auf die Menge an Protein eines jeden Versuchs bezogen. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). ***/p < 0.001 wurde als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=9-11.

Anschließend wurde über die Durchführung von Cotransfektionen mit HRE-Luciferaseplasmiden und der HIF-1α-inhibierenden shRNA 1 ein zusätzlicher Beweis für die Beteiligung von HIF-1α in der Signalweiterleitung von FAE in OLN-93 erbracht. Man sieht, dass DMF in OLN-93 die Luciferaseaktivität steigern kann, sofern diese neben HRE-Luciferaseplasmiden nur Leervektoren ohne Funktion internalisiert haben. Die Effekte bleiben aus, sobald shRNAs gegen HIF-1α im Spiel sind, die die Signalgebung der FAE über HIF-1α unterbinden (*Abb. 14A*).



Abb. 14 Auswirkung der Fumarsäureesterstimulation auf die Zelllinie OLN-93 nach Cotransfektion mit shRNAs (small hairpin Ribonukleinsäuren) gegen HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α). OLN-93 wurden mit HRE(Hypoxie-responsives Element)-Luciferaseplasmiden und der für HIF-1 α spezifischen shRNA 1 cotransfiziert und anschließend für sechs Stunden mit 30 µM Dimethylfumarat (DMF; blau), 30 µM Monomethylfumarat (MMF; rot) oder vergleichbaren Mengen an Dimethylsulfoxid (DMSO; grau) versetzt. Die Rohwerte der gemessenen Luciferaseaktivität wurden auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen und die absolute Proteinmenge normiert (A). Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=5-6.

Zusammengefasst sprechen die Erkenntnisse aus den Transfektionsversuchen für eine eminent wichtige Rolle von Nrf2 und HIF-1α bei der durch FAE induzierten Signalfortleitung in OLN-93.

3.5. Effekte der FAE auf die Laktatshuttlehypothese in OLN-93 und Wildtyp-OPCs

Das Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttle stellt einen wichtigen Beitrag in der Aufrechterhaltung der Hirnhomöostase dar und birgt über die Steigerung seiner Aktivität Möglichkeiten der unterstützenden Energiebereitstellung für Neurone. Dabei interagiert HIF-1α über die Induktion der Glykolyse und der damit verbundenen Steigerung der Laktatproduktion indirekt mit dem Laktatshuttle. Bisher ist nicht untersucht, ob FAE einen positiven Einfluss auf das Laktatshuttle ausüben können. Um dies zu beurteilen, wurde die Laktatproduktion der Zellen nach FAE-Exposition gemessen, indem aus den Zellüberständen die Menge an Laktat bestimmt wurde. Da das Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttle in engem Zusammenhang mit dem Laktattransporter MCT-1 steht und dieser speziell auf Oligodendrozyten exprimiert ist, wurde außerdem die mRNA des Transporters exemplarisch mittels qPCR auf transkriptionelle Beeinflussbarkeit durch FAE untersucht.

Über die Quantifizierungen der Laktatmenge und der mRNA-Level von MCT-1 aus OLN-93 wird ersichtlich, dass die Zelllinie weder nach DMF- noch nach MMF-Exposition eine Reaktion im Sinne einer Exportsteigerung von Laktat zeigt (*Abb. 15A* und *15B*).



Abb. 15 Verhalten der Laktatproduktion und der Expression von MCT-1 (Monocarboxylattransporter 1) in der Zelllinie OLN-93 nach Fumarsäureesterbehandlung. Darstellung der über Laktatassays ermittelten Laktatmenge (A) und der mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level an MCT-1 (B), quantifiziert über qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) in OLN-93 nach Stimulation mit 30 μ M Diethylfumarat (DEF; grün), bezogen auf unbehandelte Kontrollen (weiß), bzw. 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau) oder 30 μ M Monomethylfumarat (MMF; rot) in Bezug auf entsprechende Kontrollen mit Dimethylsulfoxid (DMSO; grau). Die Zellen wurden für die Messung der Laktatmenge für sechs Stunden stimuliert, für die Quantifizierung der MCT-1-Expression wurde eine Zeitreihe aus drei, sechs und achtzehn Stunden erstellt. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, *n*=6-12.

Effekte stellen sich hingegen in OPCs aus Wildtyptieren ein, wo nach sechs Stunden eine Laktatproduktion durch die Behandlung mit MMF sichtbar wird (*Abb. 16A*). Für DMF ergeben sich keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ebenso wenig wie für länger andauernde Behandlungen mit den beiden untersuchten FAE. Vergleichbar mit den Beobachtungen in OLN-93 tritt keine Erhöhung der Transkriptionsrate von MCT-1 nach Stimulation mit DMF und MMF auf (*Abb. 16B*).



Abb. 16 Steigerung von extrazellulärem Laktat bei OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen) aus Wildtypmäusen nach Exposition mit Monomethylfumarat. Veranschaulichung der Laktatmenge (A) und der mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level an MCT-1 (Monocarboxylattransporter 1) (B) aus Wildtyp-OPCs nach deren Stimulation mit 30 μ M Diethylfumarat (DEF), Dimethylfumarat (DMF) oder Monomethylfumarat (MMF). Die Zellen wurden für die Messung der Laktatmenge für sechs Stunden stimuliert, für die Quantifizierung der MCT-1-Expression wurde eine Zeitreihe aus drei, sechs und achtzehn Stunden erstellt. Die Rohwerte wurden mittels Laktatassay bzw. qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) erhoben und im Falle von DEF (grün) auf unbehandelte Kontrollen (weiß) oder im Falle von DMF (blau) und MMF (rot) auf mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelten Kontrollen (grau) normiert. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). ***/p < 0.001 wurde als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=6-12 (n=2-3 für DEF und den Zeitpunkt 3h).

3.6. Untersuchung von OPCs aus mSOD1(G93A)-Mäusen

3.6.1. FAE-Einfluss auf die Nrf2-Signalkaskade in transgenen OPCs

In Bezug auf die Untersuchung von Wildtypzellen kann keine Aussage über die Relevanz der Ergebnisse im Rahmen der ALS getroffen werden. Aus diesem Grund besteht großes Interesse an der Frage, ob die Gabe der FAE auch in mutierten Zellen Effekte hat und ähnliche Ergebnisse zustande bringen kann wie in unmutierten OPCs. Dies wäre hinweisend darauf, ob der Gedanke, FAE in der ALS-Therapie zu erwägen, überhaupt sinnvoll ist. Umgekehrt könnte das Ausbleiben einer Reaktion auf FAE auf eine Störung in diesen Zellen hindeuten, die in der Diskussion als ALS-Entstehungsmechanismus Aufmerksamkeit finden könnte. Daher bestand ein weiterer Versuch darin, OPCs aus der mSOD1(G93A)-Mauslinie zu isolieren und deren Verhalten in einem eigenen Experiment exemplarisch zu beurteilen. Wir finden trotz einiger Abweichungen zu den Wildtypzellen ein ähnliches Reaktionsmuster der transgenen OPCs nach FAE-Stimulation.

Der direkte Vergleich in Bezug auf die Expression von Nrf2 zeigt, dass transgene OPCs über die kurzfristige dreistündige Gabe von MMF trotz eines etwas geringeren Maßes ebenso stimulierbar sind wie die Wildtyp-OPCs (Abb. 17A). Wo in wildtypischen OPCs die Gabe von DMF bereits nach sechs Stunden sichtliche Wirkung erzeugt, tritt dieser Effekt in transgenen Zellen mit zeitlicher Verschiebung gleichem Ausmaß nach achtzehn Stunden ein. aber Die signifikante Expressionssteigerung von Nrf2 nach sechsstündiger MMF-Gabe in transgenen OPCs bleibt allerdings aus. Bei der Quantifizierung der HO-1-mRNA zeigt sich, dass DMF nach achtzehn Stunden eine Expressionssteigerung bewirkt, was in Wildtyp-OPCs bereits nach sechs Stunden auftritt (Abb. 17B). HO-1 reagiert in transgenen OPCs sensibler als in den entsprechenden Wildtypgeschwistern, da hier die Höhe der Expression durch DMF deutlicher ausfällt und zusätzlich auch DEF hochsignifikante Ergebnisse hervorbringt. Parallelen zur Situation in Wildtypmäusen lassen sich auch bei der Untersuchung der zeitlichen Zusammenhänge bei der NQO1 nach MMF-Stimulation in transgenen OPCs feststellen, da der Maximaleffekt wieder nach drei Stunden eintritt, obwohl die Höhe der Steigerung im Vergleich zu den Wildtypen geringer ausfällt (Abb. 17C). Zusätzlich bewirkt DMF auch hier wieder einen signifikanten Effekt nach achtzehn Stunden, den wir in Wildtyp-Zellen nicht beobachten können. Wir halten damit fest, dass der Nrf2-Signalweg auch in transgenen ALS-Mäusen potenziell zugänglich für die FAE-Therapie ist.



Abb. 17 Steigerung der mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level von Nrf2 (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)like 2) und den Nrf2-Zielgenen HO-1 (Hämoxygenase 1) und NQO1 (NAD(P)H-Quinone-Oxidoreduktase 1) nach Fumarsäureesterstimulation in primären OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen) aus transgenen ALS(Amyotrophe Lateralsklerose)-Mäusen. Positives Ansprechen der Transkription von Nrf2 (A), HO-1 (B) und NQO1 (C) in OPCs aus mSOD1(G93A)-Mäusen nach Gabe von 30 μ M Diethylfumarat (DEF; grün) bezogen auf unbehandelte Kontrollen (weiß) bzw. 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau) oder Monomethylfumarat (MMF; rot) bezogen auf Dimethylsulfoxid-Kontrollen (DMSO; grau). Die Analyse wurde nach der Erstellung einer Zeitreihe (3; 6; 18 Stunden) mit qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, **/p< 0.01 und ***/p < 0.001 wurde als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=6-9 (n=3 für DEF und den Zeitpunkt 3h).

3.6.2. FAE-Einfluss auf die HIF-1α-Signalkaskade in transgenen OPCs

Auch für die Interpretation der Wirkung der FAE auf den HIF-1 α -Signalweg ist es wichtig, die Vorgänge zusätzlich in mutierten mSOD1(G93A)-OPCs zu untersuchen. Um zu ergründen, ob hier durch die Mutation Hindernisse mit Störung der konsequenten Fortleitung der Signale aufgebaut werden, wurden OPCs aus ALS-Mäusen isoliert und die Expression der HIF-1 α -Zielgene nach FAE-Gabe bestimmt.

Die Expression von VEGF verhält sich in den Zellen aus den transgenen Tieren recht ähnlich zu der in Wildtypen, da ebenfalls signifikante Ergebnisse nach achtzehnstündiger DMF-Gabe dokumentiert werden können. Das Maximum der Steigerung liegt dabei etwas tiefer als in den äquivalenten Wildtypzellen (*Abb. 18A*). Weitere Gemeinsamkeiten ergibt der Vergleich von transgenen und wildtypischen OPCs im Hinblick auf die Glut-1-Expression: diese wird in beiden Zelltypen nach kurzfristiger Stimulation mit MMF für drei Stunden und nach längerfristiger Stimulation mit DMF für achtzehn Stunden auf eine vergleichbare Höhe gesteigert (*Abb. 18B*). Bei der Untersuchung der Ldha und der PDHA in transgenen Zellen lassen sich ähnliche Ergebnisse wie in Wildtyp-OPCs nachvollziehen, da keine der untersuchten Substanzen noch Zeitpunkte ein signifikantes Ergebnis erbringen (*Abb. 18C* und *18D*). Damit scheint die Induktion des HIF-1α-Signalwegs in den mutierten Zellen in vergleichbarer Ausprägung intakt zu sein wie in den unmutierten Zellen.



Abb. 18 Expressionssteigerung der Zielgene von HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α) durch Fumarsäureester in OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen) aus transgenen SOD1(Superoxiddismutase 1)-Mäusen. Darstellung der über qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) bestimmten mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) (A), des Glukosetransporters Glut-1 (B), der Laktatdehydrogenase A (Ldha) (C) und der Pyruvatdehydrogenase A (PDHA) (D) in OPCs aus transgenen mSOD1(G93A)-Mäusen nach Stimulation mit 30 μ M Diethylfumarat (DEF; grün), bezogen auf unbehandelte Kontrollen (weiß), bzw. 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau) oder 30 μ M Monomethylfumarat (MMF; rot) mit Bezug auf entsprechende Dimethylsulfoxid-Kontrollen (DMSO; grau). Die Ergebnisse sind separat für die Behandlungszeitpunkte drei, sechs und achtzehn Stunden dargestellt. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, **/p < 0.01 wurde als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, n=6-9 (n=3 für DEF und den Zeitpunkt 3h).

Wie einleitend dargestellt, besteht im Tiermodell eine enge Verbindung zwischen ALS-Symptomen und der Anwesenheit von VEGF. Es ist daher sinnvoll neben den bisherigen Versuchen noch zu untersuchen, ob sich die gesteigerte Transkription von VEGF auch in OPCs aus transgenen ALS-Mäusen in einer tatsächlichen Proteinanhäufung niederschlägt. Tatsächlich sehen wir, wie DMF die extrazelluläre VEGF-Menge signifikant anhebt (*Abb. 19A*). Genau wie in den wildtypischen Zellen bewirkt MMF hingegen nichts dergleichen.



Abb. 19 Steigerung der Produktion von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) durch Dimethylfumarat in OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen) aus transgenen mSOD1(G93A)-Mäusen. Messung der Proteinmenge von VEGF aus dem Überstand von transgenen OPCs (A) nach achtzehnstündiger Stimulation mit 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau), 30 μ M Monomethylfumarat (MMF; rot) oder Dimethylsulfoxid (DMSO; grau). Nach Durchführung des ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurden die Rohwerte auf die absolute Proteinmenge und die DMSO-Kontrollen bezogen. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). **/p < 0.01 wurde als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, *n*=6-8.

3.6.3. FAE-Einfluss auf die Laktatshuttlehypothese in transgenen OPCs

Auch Zellen aus den transgenen mSOD1(G93A)-Tieren können über FAE-Gabe positiv zur Laktatproduktion animiert werden. MMF ist hier der entscheidende Auslöser (*Abb. 20A*). Als wichtiges Detail sei hervorzuheben, dass die Laktatsteigerung bei den transgenen Mäusen im Kontrast zu den Wildtyptieren erst verzögert nach achtzehn Stunden anstatt bereits nach sechs Stunden auftritt. Allerdings ist das Ausmaß des Mengenzuwachses an Laktat im Medium von

transgenen OPCs mit dem aus Wildtypen vergleichbar. Was die Untersuchung der Expression von MCT-1 nach FAE-Stimulation in transgenen OPCs betrifft, so zeigen sich hier leichte Unterschiede zu den Ergebnissen in Wildtyptieren. Im Gegensatz zur dort dokumentierten ausbleibenden Steigerung kann man in transgenen OPCs einen signifikanten Anstieg der mRNA-Level von MCT-1 als Antwort auf die DMF-Gabe nach sechs Stunden beobachten (*Abb. 20B*).



Abb. 20 Steigerung der Laktatproduktion und der Expression von MCT-1 (Monocarboxylattransporter 1) in transgenen OPCs (Oligodendrozytenvorläuferzellen) durch Fumarsäureester. Darstellung der über Laktatassays ermittelten Laktatmenge (A) und der mRNA(messenger Ribonukleinsäure)-Level an MCT-1 (B), quantifiziert über qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) in OPCs aus transgenen mSOD1(G93A)-Mäusen nach Stimulation mit 30 μ M Diethylfumarat (DEF; grün), bezogen auf unbehandelte Kontrollen (weiß), bzw. 30 μ M Dimethylfumarat (DMF; blau) oder 30 μ M Monomethylfumarat (MMF; rot) mit Bezug auf entsprechende Dimethylsulfoxid-Kontrollen (DMSO; grau). Die Zellen wurden für die Messung der Laktatmenge für sechs oder achtzehn Stunden stimuliert, für die Quantifizierung der MCT-1-Expression wurde eine Zeitreihe aus drei, sechs und achtzehn Stunden erstellt. Die Datenanalyse erfolgte über die Durchführung von Dunnett's Multiple Comparison Test auf der Grundlage einer One-way-ANOVA (Varianzanalyse). */p < 0.05 wurde als signifikant gewertet, ***/p < 0.001 wurde als hochsignifikant gewertet. Die Werte sind als Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt, *n*=6-12 (*n*=3 für DEF und den Zeitpunkt 3h).

Als wichtige Erkenntnis ist hier festzuhalten, dass bei der Beeinflussung des Laktatshuttles vor allem MMF eine zentrale Rolle zu spielen scheint. Dies ist vor

allem deshalb von übergeordnetem Interesse, da bei der Charakterisierung des Einflusses von Fumarsäureester auf den Signalweg von HIF-1α und Nrf2 in besonderem Maße DMF als Taktgeber fungiert. Damit wirken sich DMF und MMF, obwohl die Pharmakodynamik beider Stoffe in der Bildung von intrazellulärem Fumarat resultiert, positiv auf unterschiedliche Nischen des OPC-Metabolismus aus.

4. DISKUSSION

Diese Arbeit widmete sich der Frage, ob die zwei Signalwege von HIF-1α und Nrf2 in Oligodendrozyten durch FAE in positiver Weise beeinflusst werden können und ob darüber auch die Laktatproduktion der Zellen stimuliert werden kann. In der Tat konnte gezeigt werden, dass dies sowohl in der Oligodendrozytenzelllinie OLN-93 als auch in Oligodendrozytenvorläufern (OPCs) möglich ist. Kurz gefasst führen FAE in beiden Zellarten zur Induktion von HIF-1a-Zielgenen und zu einer gesteigerten VEGF-Produktion, die auf die Stabilisierung von HIF-1a als Mechanismus zurückgeführt werden kann. Wie ursächlichen in den Arbeitshypothesen bereits formuliert, führte die FAE-Stimulation ebenfalls zu einer erhöhten Menge an Laktat im Umgebungsmedium. Zusätzlich zur Induktion von HIF-1α-Zielgenen waren auch Nrf2-Zielgene über FAE in positivem Sinne beeinflussbar, sodass wir einen geteilten Wirkmechanismus der FAE in OPCs und OLN-93 feststellen können. In den folgenden Ausführungen sollen die Beobachtungen dieser Arbeit diskutiert und im Zusammenhang des aktuellen Forschungsstandes im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen beurteilt werden.

4.1. Einsatz von FAE bei der ALS

Seitdem DMF als Pharmakotherapie bei der Multiplen Sklerose untersucht wird, ist bekannt, dass Fumarat neben der immunmodulatorischen Komponente auch über Neuroprotektion wirkt und damit einen dualen Wirkmechanismus besitzt (Albrecht *et al.*, 2012). Mit dieser Arbeit konnten wir ein Puzzlestück in der komplexen Wirkungsweise von Fumarat hinzufügen: Fumarat scheint seine Wirkung zusätzlich zur Beeinflussung von Neuronen auch über Gliazellen, und zwar im Speziellen über Oligodendrozyten, entfalten zu können. Die Tatsache, dass Fumarat in Oligodendrozyten Signalwege aktiviert, die für ihre gewinnbringende Funktion bei Neurodegeneration bekannt sind (Albrecht *et al.*, 2012; Correia und Moreira, 2010), gibt Hinweise darauf, dass Fumarat multimodale Angriffspunkte hat, die sich zum Teil erst sekundär in der beschriebenen Neuroprotektion niederschlagen. Gerade im Hinblick auf Erkrankungen, wo Oligodendrozyten Mitverursacher sind, ist daher der Einsatz von Fumarat umso mehr zu diskutieren. Neben der MS, bei der die Gabe von DMF therapeutisch bereits zugelassen ist (Venci und Gandhi, 2013), ist damit auch die ALS ein potentieller Kandidat für den Einsatz von Fumarat. Hier

Oligodendrozyten rücken mehr und mehr und deren Vorläufer als krankheitsassoziierte Zellen in den Fokus der Aufmerksamkeit, da unter anderem eine Steigerung der Differenzierungs- und Proliferationsrate der OPCs mit Bildung dysmorpher Oligodendrozyten im Verlauf ersichtlich ist (Kang et al., 2010; Kang et al., 2013; Philips et al., 2013; Philips und Rothstein, 2014). OPCs reagieren sehr sensibel auf oxidativen Stress, indem ihre weitere Ausdifferenzierung und Proliferation dadurch blockiert wird (Gard et al., 2001; Khwaja und Volpe, 2008; Miyamoto et al., 2013). Dies liegt vor allem an der bevorstehenden energieaufwändigen Myelinsynthese und wenig zur Verfügung stehendem antioxidativem Gluthation (Juurlink et al., 1998). Da gerade für die ALS ein direkter Zusammenhang mit ROS besteht, scheinen OPCs in diesem Szenario ins Hintertreffen zu geraten. Aufgrund der oben erwähnten Reifungsstörung bei ALS-Oligodendrozyten wäre es für die Zukunft von großem Interesse, zu untersuchen, ob sich FAE auch auf die Ausdifferenzierung von OPCs in unreife und reife Oligodendrozyten auswirken. Für Neurone ist HIF-1a als Differenzierungsfaktor wichtig (Zhao et al., 2014b), sodass man die gleiche Funktion auch in Oligodendrozyten propagieren kann. Kürzlich konnte dies von Yuen et al. (2014) bestätigt werden. HIF-1α scheint insbesondere in den Frühphasen der OPC-Entwicklung durch Hypoxie hochreguliert zu werden, um über VEGF eine bessere Gefäßversorgung der Zellen sicherzustellen. Sobald diese gewährleistet ist, scheint sich die weitere Überexpression von HIF-1α jedoch eher schädlich auf OPCs auszuwirken, da dies zu Hypomyelinisierung führt. Damit ist festzuhalten, dass die Gabe von FAE für die Ausreifung der OPCs zum richtigen Zeitpunkt unterstützend wirken kann. Ob dies auch mit einer ALS-Pathologie funktioniert, muss noch untersucht werden.

Aus den zellulären Funktionsstörungen bei der ALS ergibt sich eine essentielle Frage: Wenn Oligodendrozyten, wie gezeigt wurde, auf Fumarat ansprechen, tun sie dies auch in einem gestörten Umfeld mit gestörter Zellphysiologie? Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Anlass zur Vermutung, dass dies bei Vorliegen der mSOD1(G93A)-Mutation der Fall ist, da hier quantitativ ähnlich ausgeprägte Effekte erzielt werden können wie in Wildtyp-OPCs. Da in dieser Arbeit keine anderen ALSbedingten Mutationen untersucht wurden, ist weder eine Aussage zur Situation in Oligodendrozyten aus anderen ALS-Mausmodellen geschweige denn zu Oligodendrozyten aus gesunden Personen und ALS-Erkrankten möglich. Vor allem

die humane Situation *in vivo* muss zukünftig untersucht werden. Gerade weil die ALS mit ihren verschiedenen Verlaufsformen und den zugrundeliegenden Mutationen im Menschen eine sehr heterogene Erkrankung darstellt, sind Medikamentenforschungen an Tiermodellen oft nicht aussagekräftig und nicht auf die humane Erkrankung übertragbar (Bento-Abreu *et al.*, 2010; McGoldrick *et al.*, 2013; Philips und Robberecht, 2011; Sreedharan und Brown, 2013). In erster Linie ist es daher nötig, geeignete klinische Studien mit Fumarat zu etablieren und Inhomogenitäten in der Studienpopulation, die Effekte kaschieren könnten, auszubalancieren.

4.2. Relevanz der untersuchten Signalwege bei der ALS

Der Grund, warum bei der ALS gerade die Induktion der drei Signalkaskaden sinnvoll erscheint, ergibt sich aus den Endpunkten, in denen diese münden. Der Pathomechanismus der ALS wird nach wie vor kontrovers diskutiert. In vielen Arbeiten konnte allerdings herausgearbeitet werden, dass Motoneurone bei der ALS in besonderem Maß oxidativem Stress ausgesetzt sind, was zum Beispiel durch erhöhte Biomarker für ROS in ALS-Patientenproben belegt werden kann (LoGerfo et al., 2014; Niedzielska et al., 2015). Da Motoneurone per se sehr vulnerabel auf oxidative Stressoren reagieren (Parkes et al., 1998), könnte diese zusätzliche ROS-Belastung in der ALS das Maß der Kompensation übersteigen. Die ideale Reaktion in dieser Situation scheint die Erhöhung des antioxidativen Zellhaushalts, was über die Induktion von Nrf2 und seiner Zielgene erreicht werden kann (Linker et al., 2011). Über diesen Weg steigt die Proteinmenge an intrazellulärer HO-1 und NQO1, welche sehr effektiv ROS abfangen können und damit den oxidativen Stress minimieren (Chen et al., 2006; Ghoreschi et al., 2011). Im Rahmen der ALS-Forschung fallen jedoch immer mehr Anhaltspunkte ins Auge, dass Stationen des Nrf2-Signalwegs Störungen aufweisen. Zum Beispiel wird Nrf2 in Motoneuronen und Gliazellen von mSOD1(G93A)-Mäusen im Endstadium überexprimiert, wobei die Signalkaskade, anders als in Gliazellen, wo auch die Zielgene überexprimiert werden, in Motoneuronen nicht in der Überexpression der Zielgene mündet (Mimoto et al., 2012). Die Reaktion der Motoneurone kann als Störung in der Signalfortleitung dieses Signalwegs in den ALS-Mäusen interpretiert werden, während die Gliazellreaktion als Versuch der Kompensation auf den anfallenden oxidativen Stress gewertet werden kann. Über die Induktion von Nrf2 in

Astrozyten konnte zudem das Überleben von ALS-Mäusen verlängert werden, was die Aussage untermauert, dass die Induktion des Nrf2-Signalwegs im Rahmen der ALS positive Auswirkungen zu haben scheint (Vargas *et al.*, 2008). Bei genauerer Betrachtung erscheint es daher sinnvoll, diesen Mechanismus pharmakotherapeutisch zum Beispiel über FAE zu unterstützen.

Dass die Nrf2-Induktion über FAE-Gabe möglich ist, wurde in der Literatur bereits in Neuronen, Astrozyten, reifen Oligodendrozyten und OPCs gezeigt (Albrecht et al., 2012; Linker et al., 2011; Scannevin et al., 2012). Linker et al. (2011) stellten dabei fest, dass die Nrf2-Induktion besonders prominent in reifen Oligodendrozyten ist. Mit unseren Experimenten konnten wir die Ergebnisse von Scannevin et al. (2012), eine Nrf2-Induktion in OPCs aus Ratten- und Humanzellen nach sechsstündiger DMF- und achtzehnstündiger MMF-Stimulation herbeizuführen, nicht replizieren. Warum wir trotz eines sehr ähnlichen Versuchsaufbaus keine Nrf2-Induktion in unseren verwendeten Zellen finden, liegt möglicherweise an der Herkunft der Zellen aus Mäusen, an der unterschiedlichen FAE-Dosierung oder an anderen Umgebungsbedingungen. In unserem Experiment wurden nur zwei Zeitpunkte untersucht, sodass es auch möglich ist, dass der optimale Detektionszeitpunkt verpasst wurde. Da die Mehrheit der Nrf2-Zielgene bereits nach drei Stunden die maximale Expressionssteigerung aufweist, wäre es denkbar, dass in murinen OPCs die Induktion von Nrf2 bereits zu diesem Zeitpunkt maximal eintritt. Zwar können wir über die Transfektionsuntersuchungen der OLN-93 die Aussage treffen, dass Nrf2 in der Steigerung der Zielgenexpression beteiligt ist, allerdings können wir nicht mit Sicherheit sagen, ob dies über eine Induktion von Nrf2 verursacht wird.

Wiesner *et al.* (2013) konnten zeigen, dass Neurone über FAE die Transkription von Nrf2-Zielgenen selbst steigern können. Damit verfügen sie über eigene Reserven zur Abwendung oxidativer Schädigung. Verschiedene Gliazellen wie Astrozyten und OPCs haben dieselbe Möglichkeit der Expressionssteigerung von Nrf2-Zielgenen (Wiesner *et al.*, 2013) und zumindest Astrozyten können darüber indirekt Neurone schützen (Kraft *et al.*, 2004). Konzentriert man sich allerdings auf die HIF-1 α -Signalkaskade, schaffen es Neurone nicht, in adäquater Weise auf FAE mit einer Induktion von HIF-1 α -Signalgenen zu antworten (Wiesner *et al.*, 2013). Dieses Defizit muss von den umgebenden Gliazellen kompensiert werden, sodass bei HIF-1 α von einer gliazellspezifischen Induktion gesprochen wird. Einen Effekt, den wir

uns nach FAE-Stimulation für die Motoneurone erhoffen, ist die Mitnutzung der Ressourcen von HIF-1 α der umgebenden Oligodendrozyten. Indem der Metabolismus in Gliazellen durch FAE via HIF-1α auf Glykolyse umgestellt wird, können Energiereserven für Motoneurone mobilisiert werden (Semenza, 2011). Dies ist besonders aus dem Grund wichtig, weil Motoneurone nur ein begrenztes Spektrum in der Steigerung ihrer Glykolyseaktivität haben, sodass sie gerade bei schnelleintretenden Energierestriktionen an ihre Grenzen stoßen (Almeida et al., 2001). Daher scheint der Einsatz von FAE besonders dann sinnvoll, wenn Motoneurone unter unerwarteten energetischen Mangelzuständen leiden, wie beispielsweise bei der ALS, wo ein defizitärer Glukosestoffwechsel bereits früh in Motorregionen von mSOD1(G93A)-Mäusen auftritt (Browne et al., 2006). In transgenen mSOD1(G93A)-Mäusen wird HIF-1α im Endstadium in Motoneuronen und vor allem in Gliazellen überexprimiert, was bei gleich alten Wildtyptieren nicht geschieht (Sato et al., 2012). Es könnte sich hierbei um eine kompensatorische Steigerung durch eine krankheitsbedingte Desensibilisierung des Organismus oder durch eine fehlerhafte Signalweiterleitung handeln. Es wurden dabei nur Astrozyten und Mikroglia untersucht, sodass in diesem Punkt keine Aussage zum Verhalten von Oligodendrozyten getroffen werden kann. Trotz allem dürfen Spekulationen über die Bedeutung für diese Arbeit angestellt werden: diese Entdeckung legt nahe, dass gerade bei der ALS die Gliazellen in ihrer HIF-1α-Akkumulation mittels FAE unterstützt werden könnten.

4.3. ALS und VEGF

Deletionen im HRE des VEGF-Genpromotors haben ALS-ähnliche Symptome zur Folge, ebenso wie der Entzug von VEGF in mSOD1(G93A)-Mäusen, deren Symptomatik dadurch aggraviert (Lambrechts *et al.*, 2003; Oosthuyse *et al.*, 2001). Außerdem steigert die Substitution von VEGF in mSOD1(G93A)-Mäusen deren Überleben und mindert die Krankheitssymptome über Prävention des Motoneuronuntergangs, auch wenn der Krankheitsbeginn schon eingetreten ist (Azzouz *et al.*, 2004). Der Ansatz, HIF-1α über FAE anzuhäufen, gründet daher auch in der Annahme, dass darüber eine Steigerung der VEGF-Produktion erreicht werden kann, um über die Initiierung einer pseudohypoxischen Reaktion ein neurotrophes Milieu herzustellen, von dem Motoneurone profitieren können. Die Situation in ALS-Patienten lässt darauf schließen, dass auch dort ein Prozess im

VEGF-Mechanismus gestört zu sein scheint, da im Liquor dieser Kohorte im Frühstadium ein Mangel an VEGF vorherrscht (Devos et al., 2004). Nagara et al. (2013) fanden heraus, dass in Vorderhornzellen von ALS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen HIF-1 α in erhöhter und VEGF in erniedrigter Konzentration vorliegt, was die Autoren als Störung im zytoplasmatischennukleären Transport von HIF-1α einordnen. Diese Funktionsstörung scheint sich in ALS-Patienten besonders unter hypoxischen Bedingungen negativ auszuwirken, weil hier im Vergleich zu ALS-Kontrollen unter Normoxie kein Anstieg der VEGF-Konzentration auftritt (Moreau et al., 2006). In diesem Fall wäre es für die Motoneurone von Vorteil, ihren Bedarf an VEGF anderweitig beispielsweise über Gliazellen zu decken. Da Oligodendrozyten über FAE zur Produktionssteigerung von VEGF animiert werden können, könnte dies eine Möglichkeit für ALS-Motoneurone darstellen, an neuroprotektives VEGF zu gelangen. Aktuell werden klinische Phase-I- und Phase-II-Studien an ALS-Patienten durchgeführt, die intrazerebroventrikuläres VEGF erhalten (Keifer et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Studie werden unsererseits mit Spannung erwartet, da der wirkungsvolle Einsatz dieser invasiven VEGF-Substitution auch neue Einschätzungen für die Verwendung von Fumarat mit sich bringen könnte.

4.4. ALS und Laktat

Über die Anregung der Laktatproduktion in Oligodendrozyten wäre es denkbar, dass FAE mit der Induktion des Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttles einen dritten Angriffspunkt bedienen, der im Endeffekt ein besseres Nahrungsangebot für Motoneurone sicherstellt, die damit gerade Mangelzeiten stressarm überstehen könnten (Funfschilling *et al.*, 2012). Motoneurone sind bedingt durch ihre Anatomie mit ihren langen Axonen, die durch die Myelinisierung nur wenig Kontakt zum umgebenden Milieu haben, unter metabolischen Gesichtspunkten auf die Unterstützung von Oligodendrozyten angewiesen (Nave, 2010a). Außerdem sind Neurone in Bezug auf das Nahrungsmittelangebot recht wählerisch und verstoffwechseln neben Glukose gerade unter Stress bevorzugt Laktat (Schurr *et al.*, 1997). Der Grund dafür ist, dass von Laktat als Ausgangsmetabolit weniger Umwandlungsschritte bis hin zur ATP-Produktion nötig sind als von Glukose und zusätzlich keine initiale ATP-Investition wie bei Glukose nötig ist (Bliss *et al.*, 2004). Im Liquor von mSOD1(G93A)-Mäusen finden sich reduzierte Spiegel an Laktat
(Ferraiuolo *et al.*, 2011). Außerdem ist in der Arbeit von Lee *et al.* (2012) beschrieben, dass MCT-1 bei ALS-Patienten in reduzierter Form exprimiert wird. Für OPCs ist auch bekannt, dass sie in mSOD1(G93A)-Mäusen weniger MCT-1 und MBP als Myelinmarker exprimieren, sodass hier von einem Funktionsdefizit in der metabolischen Unterstützung und der Myelinisierung ausgegangen werden muss (Philips *et al.*, 2013). Damit kann spekuliert werden, ob bei der ALS die Bereitstellung von Laktat für Motoneurone fehlerhaft ist. Ähnlich zu unseren Ergebnissen finden sich auch in der Arbeit von Isaacs *et al.* (2005) Hinweise, dass Fumarat zur Mehrsynthese von Laktat führt. Umso mehr rücken damit unsere Ergebnisse der Laktatproduktionssteigerung in OPCs in ein für die ALS-Therapie zuträgliches Licht.

Dadurch, dass über HIF-1α eine Umstellung des Stoffwechsels über Induktion der Glykolyse mit gleichzeitiger Hemmung der Atmungskette vollzogen wird (Semenza, 2011), ist es möglich, dass diese beiden Wege gekoppelt sind und der Laktatexport ebenfalls über die Anreicherung von HIF-1α vermittelt wird. Eine interessante Entdeckung machten Colegio et al. (2014), als sie feststellten, dass Laktat umgekehrt ein Induktor für die HIF-1a-Stabilisierung sein kann. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten der Interpretation: entweder kommt es über die durch FAE eingeleitete HIF-1α-Stabilisierung zur Laktatüberproduktion. Damit würde ein sich selbst verstärkender Mechanismus entstehen, indem das über HIF-1α angereicherte Laktat die HIF-1α-Stabilisierung über ein Feedbacksignal unterhält. Die zweite Art der Interpretation wäre, dass FAE über einen noch unbekannten Mechanismus direkt die Überproduktion von Laktat bewirken, was dann sekundär HIF-1a akkumulieren ließe. Zum aktuellen Zeitpunkt sind nur Spekulationen zu diesen beiden Erklärungsansätzen möglich, sodass zur Beantwortung weitere Forschung betrieben werden muss.

Mit großer Wahrscheinlichkeit geschieht die Ausschleusung von Laktat aus OPCs nicht wie vermutet über ein Mehrangebot von MCT-1, da bei Wildtypzellen keine Induktion der MCT-1-Genexpression durch FAE nachgewiesen werden konnte. Ullah *et al.* (2006) konnten zeigen, dass MCT-1 im Gegensatz zu MCT-4 nicht über HIF-1α überexprimiert werden kann. Diese Aussage können wir mit unseren Ergebnissen in Wildtyp-OPCs untermauern. Neben MCT-1 spielt im Rahmen des Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttles zusätzlich MCT-2 eine wichtige Rolle, sodass auch eine Expressionssteigerung von MCT-2 auf Motoneuronen über FAE

zu diskutieren ist. Neurone können bei Überexpression ihrer MCT-2-Transporter und vermehrtem Laktatimport vor dem Zelluntergang durch exzitotoxischen Stress bewahrt werden, sodass sich dieser Diskussionspunkt als ein weiterer Mechanismus der FAE herausstellen könnte (Bliss *et al.*, 2004). Auch zu diesem Punkt haben Ullah *et al.* (2006) bereits Vorarbeit an anderen Zelltypen als Neuronen geleistet, wo sie eine Überexpression von MCT-2 durch HIF-1α verneinen konnten. Dennoch besteht weiterhin die Möglichkeit, dass dies in Neuronen durch FAE möglich ist, sodass hierzu weitere Experimente durchgeführt werden sollten.

Der Vergleich von MCT-1 in Wildtypzellen und transgenen Zellen ergibt Abweichungen nach der FAE-Stimulation, die hinweisend darauf sein könnten, dass an dieser Stelle eine mechanistische Störung vorliegt, die ALS-assoziiert sein könnte. Noch wichtiger als diese Beobachtung ist allerdings, dass die transgenen Zellen trotz der Störung auf Kosten einer zeitlichen Verzögerung quantitativ auf den gleichen Laktatexport kommen wie die Wildtypzellen. Somit scheinen Kompensationsmechanismen der transgenen Zellen zu existieren, mit denen sie sich ähnliche Konditionen wie die Wildtypzellen schaffen können. Insgesamt erscheint Fumarat damit auch für die Induktion dieses Signalwegs für die ALS-Therapie einsetzbar.

4.5. ALS und Oligodendrozyten

Über den Vergleich der Zelllinie OLN-93 mit OPCs aus Wildtyptieren konnten wir die unterschiedliche Physiologie der beiden Zelltypen in Bezug auf Fumarsäureester explorieren und feststellen, dass OLN-93 zum Teil sensibler auf die Stimulation reagieren als die Primärkulturen. Im Besonderen fällt dies bei der Expressionssteigerung der Nrf2-Zielgene auf, die in OLN-93-Zellen zum Teil extrem hoch ausfällt. Über die Gründe, warum dies der Fall ist, kann nur spekuliert werden. Generell spiegelt die Zelllinie hier eher weniger die nach den Arbeitshypothesen zu erwartenden Ergebnisse wieder. Zum Beispiel tritt bei der Untersuchung der PDHA statt einer Transkriptionshemmung über den negativen Einfluss von HIF-1a der gegenteilige Effekt mit Steigerung der Expression ein. Dies mag seinen Ursprung darin haben, dass Zelllinien wie OLN-93 durch den Immortalisierungsvorgang auch in ihrer Physiologie verändert werden (Carnero et al., 2015). Beispielsweise konnten wir auch beobachten, dass die Rohwerte der Laktatproduktion in OLN-93 im Gegensatz zu den primären OPCs um ein Vielfaches höher ausfielen, was für eine Veränderung des Energiemetabolismus in diesen Zellen spricht. Trotz dieser hohen Ausgangwerte sehen wir in OLN-93 keinen signifikant höheren Laktatexport durch FAE, was unter anderem durch die Überexpression der PDHA bedingt sein könnte, die die Laktatbildung in diesen Zellen untergräbt. Die Arbeitsgruppe um Thiessen et al. (2010) stellte bei ihrer Untersuchung von OLN-93 ebenfalls Unterschiede zu sekundären Oligodendrozytenkulturen fest. Die Übertragbarkeit der Effekte in Zelllinien auf die Situation in vivo ist daher nicht immer eins zu eins möglich und erklärt möglicherweise die Diskrepanzen. Außerdem sind OLN-93, erkennbar an ihrer Ausstattung mit Oberflächenantigenen, eher der Gruppe der unreifen Oligodendrozyten anstatt der Oligodendrozytenvorläufer zuzuordnen (Richter-Landsberg und Heinrich, 1996). Aufgrund dessen ist es möglich, dass sich reifungsbedingt Veränderungen in der Zellphysiologie ergeben, die ein solches Ergebnis hervorbringen. Besonders interessant wäre in diesem Zusammenhang daher auch die Untersuchung der Reaktion von unreifen und reifen Oligodendrozyten aus primären Zellkulturen auf FAE, um den Faktor der Immortalisierung beurteilen zu können. Damit könnte eine verlässlichere und für die Beurteilung der FAE-Reaktion repräsentativere Aussage getroffen werden.

Experimente mit reifen Oligodendrozyten wären auch deshalb interessant, weil momentan noch nicht mit Sicherheit feststeht, welche Entwicklungsstufe der Oligodendrozyten bei der ALS vordergründig betroffen ist und am Krankheitsgeschehen mitwirkt. Da auch reife Oligodendrozyten Pathologien im Rahmen der ALS aufweisen, wäre es sinnvoll, reife transgene Zellen auf deren Reagibilität nach FAE-Stimulation zu untersuchen (Brettschneider et al., 2014; Niebroj-Dobosz et al., 2007). Vor allem die Auswirkungen von FAE auf das Laktatshuttle in ausgereiften Zellen ist von großem Interesse: wir wissen, dass OPCs, bedingt durch ihren noch in der Entwicklung befindlichen Status, zur Verfügung stehende Energie in erster Linie für den eigenen Metabolismus verwenden und sich unter hypoglykämischen Bedingungen nicht weiter ausdifferenzieren, proliferieren oder migrieren (Yan und Rivkees, 2006; Zuppinger et al., 1981). In diesem Stadium nehmen sie selbst zusätzlich zu Glucose Laktat über MCT-1 auf (Rinholm et al., 2011; Sanchez-Abarca et al., 2001). Sobald die Myelinisierung abgeschlossen ist, kehrt sich diese auf den eigenen Stoffwechsel zentrierte Orientierung um, sodass der reife Oligodendrozyt in der Lage ist, ihn umgebende Neurone mit für ihn überschüssigen Nährstoffen zu versorgen

(Funfschilling 2012). Störungen in diesem Szenario zum Beispiel in Form eines Mangels an MCT-1 kommen auch in ALS-Patienten zum Tragen (Lee *et al.*, 2012). Typischerweise wird bei einem Knock-out von MCT-1 trotz des Ursprungs in Oligodendrozyten eine Neurodegeneration ohne begleitende Demyelinisierung beobachtet (Lee *et al.*, 2012): dies ist ein klassisches Merkmal der ALS. Die Behandlung von ausgereiften Oligodendrozyten mit FAE könnte Aufschluss darüber geben, ob die in dieser Arbeit beschriebene Stimulierbarkeit der Vorläuferzellen durch die Generationen erhalten bleibt. Gerade weil reife Oligodendrozyten und nicht etwa OPCs die zentralen Funktionäre im Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttle sind, kann nur über reife Oligodendrozyten beurteilt werden, ob das Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttle über FAE induzierbar ist.

4.6. Oligodendrozyten versus Astrozyten bei der ALS

Wiesner et al. (2013) konnten kürzlich zeigen, dass HIF-1a auch in Astrozyten über FAE zur Akkumulation gebracht werden kann. Vergleichbar mit unseren Ergebnissen führt DMF auch in Astrozyten zur Überexpression verschiedener HIF-1α-Zielgene sowie zur Produktionssteigerung von VEGF im Umgebungsmedium. Darüber hinaus sind in Astrozyten auch Nrf2-Zielgene durch FAE beeinflussbar. Ein wichtiger Unterschied der Astrozyten zu den Oligodendrozyten ist allerdings die Höhe der Induktion der beiden Signalwege. Vergleicht man in dieser Arbeit die Maximaleffekte im Nrf2- und im HIF-1α-Signalweg, fällt auf, dass in Oligodendrozyten beide in gleichem Ausmaß gesteigert werden. Vor allem aus den Transfektionsversuchen mit der VEGF-Luciferase wird dies ersichtlich, da der HIF-1α-Knock-down zur völligen Reduktion der Effekte auf das Ausgangsniveau führt. Gleiches gilt für den Nrf2-Knock-down, sodass hier beide Signalwege einen vergleichbar großen Anteil an den Effekten haben. In Astrozyten hingegen scheint Nrf2 eine prominentere Rolle bei der FAE-Einwirkung zu spielen. Außerdem ist es in Astrozyten aus mSOD1(G93A)-Mäusen im Unterschied zu unseren Ergebnissen nicht möglich, sie in vergleichbarem Ausmaß zur HIF-1a-Stabilisierung zu stimulieren wie Wildtypastrozyten. Der Nrf2-Signalweg ist in Astrozyten dagegen ohne Einschränkung auch in transgenen Tieren induzierbar. Es können nur Vermutungen angestellt werden, worin die Ursache dafür liegt. Möglich wären beispielsweise Unterschiede in der Expression des mutierten SOD1-Proteins in den beiden Gliaarten, die sich in Astrozyten aus ALS-Mäusen als Störung in der

Fortleitung des FAE-Signals auf HIF-1α manifestiert, Oligodendrozyten aus ALS-Mäusen aber unbeeinflusst lässt. Dieses Defizit der Astrozyten könnte den Einsatz von FAE als ALS-Medikamente im Hinblick auf die Zugewinne auf den HIF-1α-Signalweg erschweren. Genauso gut könnten aber die zuträglichen Auswirkungen auf HIF-1α in transgenen Oligodendrozyten diesen Mangel aufwiegen, sodass eine Symptomreduktion bei ALS-Patienten dennoch eintreten könnte. Für die Beantwortung dieser Frage führt kein Weg an der Testung der Substanzen *in vivo* vorbei.

4.7. FAE-Derivate in der Diskussion

Eine weitere entscheidende Entdeckung dieser Arbeit war die vorwiegend selektive Induktion der Laktatproduktion über MMF, wohingegen HIF-1α und Nrf2 besonders effizient von DMF beeinflusst werden. Diese Erkenntnis eröffnet neue Ansätze zur Beurteilung des Einsatzes der beiden Substanzen DMF und MMF in der therapeutischen Praxis. Warum DMF und MMF eine so unterschiedliche Reaktion aufweisen, ist mit den bisher vorliegenden wissenschaftlichen Daten nicht zu beantworten. Glaubt man den Erkenntnissen aus der Literatur, sollte sich die Wirkung von DMF nicht sonderlich zu der von MMF unterscheiden, da DMF durch zelluläre Esterasen rapide zu MMF verstoffwechselt wird (Werdenberg et al., 2003). Im Endeffekt sollte die Exposition von DMF zu einer Steigerung von MMF im Umgebungsmilieu führen, was einer direkten MMF-Gabe gleichkommen sollte. Dennoch beobachten wir ein unterschiedliches Bild zur Theorie. Interessanterweise tauchen diese Diskrepanzen auch bei anderen Arbeitsgruppen auf (Schilling et al., 2006; Thiessen et al., 2010). Zum einen könnte man diese Beobachtung so einordnen, dass durch die Abspaltung der Methylgruppe von DMF ein zusätzlicher Signalweg in Gang kommt, der die Unterschiede erklärt. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass MMF durch die fehlende Methylgruppe kinetisch anders aufgenommen wird als DMF, auch wenn es dafür noch keine konkreten Erklärungsansätze in der Literatur gibt. Die Antwort auf die Frage, ob diese Unterschiede wie in diesem Projekt nur in vitro auftreten oder auch in vivo nachgewiesen werden können, bleiben wir schuldig. Deshalb ist es von immensem Interesse für die Beurteilung von DMF in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen im Menschen, diesen Fragen im lebenden Organismus nachzugehen.

Warum bei unseren Ergebnissen die Entfaltung der maximalen DMF-Wirkung länger dauert als die von MMF, widerspricht vielen Publikationen anderer Laborgruppen. Albrecht et al. (2012) beschreiben beispielsweise, dass sich ein protektiver Effekt von MMF im Vergleich zu DMF erst extrem verzögert einstellt. Auch bei Scannevin et al. (2012) treten die MMF-Effekte erst mit einer Latenz ein. Der Grund, warum wir in unserer Arbeit eine abweichende Dynamik beobachten, ist unklar. Möglicherweise liegt dies an unterschiedlichen Untersuchungsqualitäten. In der Arbeit von Albrecht et al. (2012) wurden zum Beispiel neuronale Zellen auf ihr Überleben untersucht, sodass die Unterschiede zelltypbedingt bzw. durch die Messung einer anderen Zielgröße bedingt sein könnten. Eine zweite Erklärung könnte die Durchführung der Experimente unter unterschiedlichen Laborbedingungen sein. Die Effekte, die unter FAE-Stimulation auftreten, sind je nach Stimulationslänge unterschiedlich ausgeprägt. Die Synthese einiger Myelinlipide sinkt beispielsweise in einer Oligodendrozytenzelllinie nach DMF-Gabe für 24 Stunden ab, bevor sie anschließend nach 72 Stunden wieder steigt (Huang et al., 2015). Daher wäre eine Untersuchung der fokussierten Signalwege in unserer Arbeit auf lange Sicht sicherlich auch sinnvoll. Dies ist auch deshalb wichtig, weil länger für pharmakologischen Einsatz von FAE den bestehende Medikamentenspiegel im Körper erreicht werden, die sich anders auswirken könnten, als die kurzfristige Stimulation für maximal achtzehn Stunden wie in dieser Arbeit.

In der Literatur findet sich ein Beispiel, in welchem DMF auch als inhibitorischer Faktor für die Funktion von HIF-1α beschrieben wird (Zhao *et al.*, 2014a). Allerdings entdeckten die Autoren dieser Arbeit diesen Zusammenhang in Osteoblastenzellen, was die gegensätzlichen Ergebnisse zu unserer Arbeit hinreichend erklären kann. Damit scheint DMF auch organspezifisch einen variablen Einfluss auf diesen Signalweg zu besitzen.

Die Untersuchung von DEF wurde im Verlauf der Versuchsphase eingestellt, da sich in der Expressionsuntersuchung der verschiedenen Zielgene oft nur sehr geringe und zum Teil auch keine signifikanten Effekte abzeichneten. Diese Entdeckung machen auch andere Arbeitsgruppen, so zum Beispiel Nibbering *et al.* (1993), die für ethyliertes Fumarat im Gegensatz zu methylierten Derivaten keine Stimulation von Granulozyten nachweisen konnten. Bei Psoriasispatienten wird DMF in Kombination mit einer ethylierten Fumaratform (Monoethylfumarat/MEF)

verabreicht, da DMF alleine in dieser Erkrankung weniger wirkungsvoll ist als in Kombination mit MEF (Litjens *et al.*, 2004a). Bei der MS-Therapie reicht DMF als Einzelsubstanz für die Behandlung aus (Rote Liste, 2016). Da DEF bisher nicht therapeutisch eingesetzt wird, wurde entschieden, weitere Versuche einzustellen und sich auf Tests mit DMF und MMF zu konzentrieren.

4.8. HIF-1α und MS

Neben der ALS gibt es verschiedene andere neurodegenerative Erkrankungen, wie M. Alzheimer, M. Parkinson, M. Huntington oder Multiple Sklerose. Für diese Erkrankungen gibt es mehr und mehr Anhaltspunkte, dass auch dort Dysregulationen von HIF-1α vorzufinden sind (Correia und Moreira, 2010; Deng *et al.*, 2016). Fortfolgend wollen wir unsere Aufmerksamkeit im Besonderen noch auf die Multiple Sklerose richten und die Möglichkeit der HIF-1α-Beteiligung auch in dieser Erkrankung vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse diskutieren.

Ursächlich für die Entstehung der MS ist die durch Inflammation bedingte progrediente Schädigung von reifen Oligodendrozyten und einer gleichzeitig auftretenden Neurodegeneration (Louapre und Lubetzki, 2015; Trapp et al., 1998). An der stattfindenden Remyelinisierung sind vordergründig OPCs beteiligt, wobei ihre Differenzierung im chronifizierten Stadium ins Stocken gerät (Kuhlmann et al., 2008; Levine et al., 2001). Vor diesem Gesichtspunkt sind die Ergebnisse dieser Arbeit auch für die Multiple Sklerose wichtig. Die axonale Schädigung ist nicht nur durch die inflammatorische Demyelinisierung bedingt, sondern auch durch ein metabolisches Defizit der Neuronen in Form einer durch Sauerstoffmangel auftretenden Energierestriktion, wie die Publikation von Davies et al. (2013) zeigt. Dies äußert sich auch darin, dass chronisch demyelinisierte Neurone vermehrt Mitochondrien anreichern (Andrews et al., 2006). Im Liquor von MS-Patienten sind die Laktatspiegel wahrscheinlich als Zeichen einer Dysfunktion im mitochondrialen Energiemetabolismus erhöht (Regenold et al., 2008). Damit ist auch bei der MS die Beteiligung des Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttles an der neuronalen Energieversorgung zu diskutieren, auch wenn die metabolischen Probleme in der MS anderer Art zu sein scheinen als bei der ALS. Unsere Ergebnisse lassen vermuten. dass HIF-1α zumindest in Oligodendrozytenvorläufern eine für Schlüsselfunktion deren Homöostase einnehmen. Gerade der Pathomechanismus der MS ausgehend von Oligodendrozyten legt die Frage nahe,

ob auch hier HIF-1α in seiner Funktionalität verändert ist. Der Einsatz von DMF in der MS-Therapie reduziert die Rückfallrate der Erkrankung nachweislich (Gold et al., 2012). Bisher wurde in diesem Zusammenhang vor allem der Einfluss von antioxidativem Nrf2 als essentieller Faktor betont, da oxidativer Stress auch bei der Multiplen Sklerose eine entscheidende Ursache zu sein scheint (Albrecht et al., 2012; Linker et al., 2011). Kürzlich wurde jedoch publiziert, dass FAE bei Knock-out Nrf2 in einem MS-Mausmodell trotzdem antiinflammatorische und von immunmodulatorische Aktivität besitzen, was für die Mitwirkung zusätzlicher Vermittlermoleküle spricht (Schulze-Topphoff et al., 2016). Die Ergebnisse unserer Arbeit bringen HIF-1a als glykolytisches und vaskulogenes Molekül in die Diskussion der neuroprotektiven Effekte. Sun et al. (2010) konnten zeigen, dass Oligodendrozyten bei der MS durch Methylprednisolon über die Akkumulation von HIF-1α vor exzitatorischem Stress bewahrt werden können. Es wurde außerdem bereits gezeigt, dass in aktiven Läsionen der weißen Hirnsubstanz mit nachgewiesener Oligodendrozytenapoptose ein Überangebot an HIF-1α herrscht (Aboul-Enein et al., 2003). Dies wird von den Autoren als reaktive Produktion von HIF-1a auf hypoxieähnliche Zustände interpretiert. Wenn dies tatsächlich der Fall ist, ist es denkbar, dass Oligodendrozyten in der MS-Therapie vom zusätzlichen Angebot von HIF-1α durch FAE-Gabe profitieren. Der Plausibilität dieser Hypothese wurde jedoch bisher noch nicht in Form von wissenschaftlichen Experimenten nachgegangen.

4.9. Fazit

Zusammengefasst ist uns in dieser Arbeit der Beweis gelungen, dass FAE in Oligodendrozytenvorläufern Signalwege von HIF-1α und Nrf2 induzieren und die Laktatproduktion steigern können. Diese Erkenntnis ist vordergründig von Interesse, weil sich dadurch innovative Einschätzungen und neue Optionen für den Einsatz dieser Medikamente bei neurodegenerativen Erkrankungen eröffnen. Vor allem im Hinblick auf die ALS, wo zurzeit nur Riluzol als signifikant wirksames Medikament auf dem Markt erhältlich ist, legen die Entdeckungen dieser Arbeit nahe, das Potenzial von FAE als Therapeutika auszutesten. Durch die jahrelange Etablierung als Medikament bei Psoriasispatienten und das gut verträgliche, risikoarme Nebenwirkungsprofil wäre die Initiierung der Erprobung am Menschen zügig möglich (Altmeyer *et al.*, 1994; Gold *et al.*, 2012).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine innerhalb von wenigen Jahren fatal verlaufende Motoneuronerkrankung mit bisher sehr begrenzten pharmakotherapeutischen Maßnahmen. Erst kürzlich wurde für die Therapie der Multiplen Sklerose, einer ebenfalls neurodegenerativen Erkrankung, mit der Zulassung von Dimethylfumarat (DMF) aus der Gruppe der Fumarsäureester (FAE), ein neuer medikamentöser Ansatz gefunden, der über die Beeinflussung verschiedener Ansatzpunkte neuroprotektive Eigenschaften an den Tag legt. Neben der Induktion des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2 (Nukleärer Faktor (erythroid-derived 2)-like 2) bewirken FAE eine Stabilisierung des Hypoxieinduzierten Faktors 1a (HIF-1a), der in Zellen über die Expressionssteigerung des Wachstumsfaktors VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) vaskulogen und über die Induktion verschiedener Enzyme den Zellstoffwechsel auf Glykolyse ausrichtet. Neben diesen beiden Signalkaskaden, die in verschiedener Art und Weise pathomechanistisch mit der ALS in Verbindung gebracht werden, fokussiert sich die ALS-Forschung zunehmend auf die Untersuchung des Oligodendrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttles. Dabei handelt es sich um ein Modell für die metabolische Versorgung von Neuronen über einen Laktattransfer aus Oligodendrozyten, das bei der ALS an verschiedenen Stellen gestört zu sein scheint. In Bezug auf das Laktatshuttle wurde bisher nicht untersucht, ob über FAE eine Steigerung der Transportkapazität erreicht werden kann.

In dieser Arbeit wurden die Oligodendrozytenzelllinie OLN-93 und primäre Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) aus Mäusepräparationen mit den FAE-Derivaten Dimethylfumarat (DMF) und Monomethylfumarat (MMF) stimuliert und verschiedene Stationen der Signalwege von Nrf2, HIF-1α und des Oligodendrozyten-Neuronen-Laktatshuttles auf Funktionalität untersucht. Um die Verbindung zur ALS herzustellen, führten wir zusätzlich Experimente mit OPCs aus dem transgenen ALS-Mausmodell mSOD1(G93A) durch, um auch das Ansprechen dieser mutierten Zellen auf FAE zu testen. Die drei Haupthypothesen dieser Arbeit lauteten dabei:

- (I) FAE stabilisieren HIF-1 α in OPCs und der Zelllinie OLN-93
- (II) FAE induzieren Nrf2 in OPCs und der Zelllinie OLN-93
- (III) FAE steigern die Laktatproduktion in OPCs und der Zelllinie OLN-93

Sowohl für die Zelllinie OLN-93 als auch für OPCs aus Wildtyptieren und transgenen SOD1-Mäusen konnten wir diese Hypothesen bestätigen. Damit wirkt FAE in den untersuchten Oligodendrozyten *in vitro* in dreifacher Weise neuroprotektiv: erstens über die Induktion des neuroprotektiven Transkriptionsfaktors Nrf2, zweitens über die Expressionssteigerung des neuroprotektiven Wachstumsfaktors VEGF und drittens über die Überproduktion des neuroprotektiven Nährstoffs Laktat. Mit diesen Ergebnissen der Oligodendrozytenreaktion auf FAE können wir neue Erkenntnisse zur Einschätzung von DMF als ALS-Therapeutikum liefern. Gerade da Oligodendrozyten und ihre Vorläufer mehr und mehr mit der Entstehung einer ALS in Verbindung gebracht werden, erscheint es sinnvoll, die Dysfunktionen dieser Zellen mit therapeutischen Mitteln gezielt zu überwinden. Wie wir zeigen konnten, besitzen FAE dazu das Potenzial. Aus diesem Grund sollten sie zukünftig als pharmakotherapeutischer Ansatz für die ALS-Therapie in Betracht gezogen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Stefferl A, Bruck W, Lucchinetti C, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H. 2003. Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. J Neuropathol Exp Neurol 62:25-33.
- Albrecht P, Bouchachia I, Goebels N, Henke N, Hofstetter HH, Issberner A, Kovacs Z, Lewerenz J, Lisak D, Maher P, Mausberg AK, Quasthoff K, Zimmermann C, Hartung HP, Methner A. 2012. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. J Neuroinflammation 9:163-2094-9-163.
- 3. Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, van den Berg LH. 2012. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol 124:339-352.
- 4. Almeida A, Almeida J, Bolanos JP, Moncada S. 2001. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. Proc Natl Acad Sci U S A 98:15294-15299.
- Altmeyer PJ, Matthes U, Pawlak F, Hoffmann K, Frosch PJ, Ruppert P, Wassilew SW, Horn T, Kreysel HW, Lutz G. 1994. Antipsoriatic effect of fumaric acid derivatives. Results of a multicenter double-blind study in 100 patients. J Am Acad Dermatol 30:977-981.
- Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL. 1995. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZnsuperoxide dismutase. Nat Genet 10:61-66.
- 7. Andrews H, White K, Thomson C, Edgar J, Bates D, Griffiths I, Turnbull D, Nichols P. 2006. Increased axonal mitochondrial activity as an adaptation to myelin deficiency in the Shiverer mouse. J Neurosci Res 83:1533-1539.
- 8. Arbiser JL. 2011. Fumarate esters as angiogenesis inhibitors: key to action in psoriasis?. J Invest Dermatol 131:1189-1191.
- Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. 2004. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. Nature 429:413-417.
- 10. Barateiro A, Fernandes A. 2014. Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. Biochim Biophys Acta 1843:1917-1929.
- 11. Barres BA, Raff MC. 1993. Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. Nature 361:258-260.

- 12. Beckman JS, Estevez AG, Crow JP, Barbeito L. 2001. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. Trends Neurosci 24:S15-20.
- 13. Behrooz A, Ismail-Beigi F. 1999. Stimulation of Glucose Transport by Hypoxia: Signals and Mechanisms. News Physiol Sci 14:105-110.
- 14. Behrooz A, Ismail-Beigi F. 1997. Dual control of glut1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation. J Biol Chem 272:5555-5562.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. N Engl J Med 330:585-591.
- 16. Bento-Abreu A, Van Damme P, Van Den Bosch L, Robberecht W. 2010. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurosci 31:2247-2265.
- Berthet C, Castillo X, Magistretti PJ, Hirt L. 2012. New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia: Extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration. Cerebrovascular Diseases 34:329-335.
- Berthet C, Lei H, Thevenet J, Gruetter R, Magistretti PJ, Hirt L. 2009. Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 29:1780-1789.
- Bliss TM, Ip M, Cheng E, Minami M, Pellerin L, Magistretti P, Sapolsky RM. 2004. Dual-gene, dual-cell type therapy against an excitotoxic insult by bolstering neuroenergetics. J Neurosci 24:6202-6208.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. Science 312:1389-1392.
- 21. Bomprezzi R. 2015. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. Ther Adv Neurol Disord 8:20-30.
- Brettschneider J, Arai K, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Lee EB, Kuwabara S, Shibuya K, Irwin DJ, Fang L, Van Deerlin VM, Elman L, McCluskey L, Ludolph AC, Lee VM, Braak H, Trojanowski JQ. 2014. TDP-43 pathology and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. Acta Neuropathol 128:423-437.
- Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, Suh E, Van Deerlin VM, Wood EM, Baek Y, Kwong L, Lee EB, Elman L, McCluskey L, Fang L, Feldengut S, Ludolph AC, Lee VM, Braak H, Trojanowski JQ. 2013. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 74:20-38.

- 24. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases 1:293-299.
- 25. Brown AM, Wender R, Ransom BR. 2001. Metabolic substrates other than glucose support axon function in central white matter. J Neurosci Res 66:839-843.
- Browne SE, Yang L, DiMauro JP, Fuller SW, Licata SC, Beal MF. 2006. Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. Neurobiol Dis 22:599-610.
- 27. Bruick RK, McKnight SL. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science 294:1337-1340.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science 281:1851-1854.
- 29. Burness CB, Deeks ED. 2014. Dimethyl fumarate: a review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. CNS Drugs 28:373-387.
- Butt AM, Duncan A, Hornby MF, Kirvell SL, Hunter A, Levine JM, Berry M. 1999. Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. Glia 26:84-91.
- Carnero A, Blanco-Aparicio C, Kondoh H, Lleonart ME, Martinez-Leal JF, Mondello C, Scovassi AI, Bisson WH, Amedei A, Roy R, Woodrick J, Colacci A, Vaccari M, Raju J, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Salem HK, Memeo L, Forte S, Singh N, Hamid RA, Ryan EP, Brown DG, Wise JP S, Wise SS, Yasaei H. 2015. Disruptive chemicals, senescence and immortality. Carcinogenesis 36 Suppl 1:S19-37.
- Cater HL, Benham CD, Sundstrom LE. 2001. Neuroprotective role of monocarboxylate transport during glucose deprivation in slice cultures of rat hippocampus. J Physiol 531:459-466.
- Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C. 2006. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol 290:H1862-70.
- Chio A, Mora G, Calvo A, Mazzini L, Bottacchi E, Mutani R, PARALS. 2009. Epidemiology of ALS in Italy: a 10-year prospective population-based study. Neurology 72:725-731.

- 35. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH,Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. Science 302:113-117.
- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R. 2014. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature 513:559-563.
- 37. Correia SC, Moreira PI. 2010. Hypoxia-inducible factor 1: a new hope to counteract neurodegeneration?. J Neurochem 112:1-12.
- 38. Dal Canto MC, Gurney ME. 1994. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. Am J Pathol 145:1271-1279.
- Davies AL, Desai RA, Bloomfield PS, McIntosh PR, Chapple KJ, Linington C, Fairless R, Diem R, Kasti M, Murphy MP, Smith KJ. 2013. Neurological deficits caused by tissue hypoxia in neuroinflammatory disease. Ann Neurol 74:815-825.
- 40. de Jong R, Bezemer AC, Zomerdijk TP, van de Pouw-Kraan T, Ottenhoff TH, Nibbering PH. 1996. Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. Eur J Immunol 26:2067-2074.
- 41. Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, Couraud F, Zalc B, Lubetzki C. 1996. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. Proc Natl Acad Sci U S A 93:9887-9892.
- Deng HX, Zhai H, Bigio EH, Yan J, Fecto F, Ajroud K, Mishra M, Ajroud-Driss S, Heller S, Sufit R, Siddique N, Mugnaini E, Siddique T. 2010. FUSimmunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 67:739-748.
- 43. Deng W, Feng X, Li X, Wang D, Sun L. 2016. Hypoxia-inducible factor 1 in autoimmune diseases. Cell Immunol 303:7-15.
- 44. Devos D, Moreau C, Lassalle P, Perez T, De Seze J, Brunaud-Danel V, Destee A, Tonnel AB, Just N. 2004. Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. Neurology 62:2127-2129.
- 45. Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. 2000. Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene. J Biol Chem 275:40134-40141.
- 46. Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. 2007. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. Nat Neurosci 10:608-614.

- 47. Doyle JP, Colman DR. 1993. Glial-neuron interactions and the regulation of myelin formation. Curr Opin Cell Biol 5:779-785.
- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA, Griffiths IR. 2004. Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. J Cell Biol 166:121-131.
- 49. Ekegren T, Hanrieder J, Aquilonius SM, Bergquist J. 2006. Focused proteomics in post-mortem human spinal cord. J Proteome Res 5:2364-2371.
- 50. Ellrichmann G, Petrasch-Parwez E, Lee DH, Reick C, Arning L, Saft C, Gold R, Linker RA. 2011. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. PLoS One 6:e16172.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell 107:43-54.
- 52. Estevez AG, Crow JP, Sampson JB, Reiter C, Zhuang Y, Richardson GJ, Tarpey MM, Barbeito L, Beckman JS. 1999. Induction of nitric oxidedependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. Science 286:2498-2500.
- 53. Etxeberria A, Mangin JM, Aguirre A, Gallo V. 2010. Adult-born SVZ progenitors receive transient synapses during remyelination in corpus callosum. Nat Neurosci 13:287-289.
- 54. Fancy SP, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJ, Rowitch DH. 2011. Myelin regeneration: a recapitulation of development?. Annu Rev Neurosci 34:21-43.
- Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR, Barber S, Greenald D, Kirby J, Shaw PJ. 2011. Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. Brain 134:2627-2641.
- 56. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 380:439-442.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol 16:4604-4613.
- Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT, Viglietta V, Dawson KT. 2012. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. N Engl J Med 367:1087-1097.

- Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Mobius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA. 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. Nature 485:517-521.
- Gard AL, Solodushko VG, Waeg G, Majic T. 2001. 4-Hydroxynonenal, a lipid peroxidation byproduct of spinal cord injury, is cytotoxic for oligodendrocyte progenitors and inhibits their responsiveness to PDGF. Microsc Res Tech 52:709-718.
- Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, Hussain RZ, Gocke AR, Respa A, Glocova I, Valtcheva N, Alexander E, Feil S, Feil R, Schulze-Osthoff K, Rupec RA, Lovett-Racke AE, Dringen R, Racke MK, Rocken M. 2011. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. J Exp Med 208:2291-2303.
- Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI, Dawson KT, DEFINE Study Investigators. 2012. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 367:1098-1107.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. Science 280:1610-1613.
- 64. Gurney ME. 1994. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 331:1721-1722.
- 65. Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. 1998. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. Glia 23:249-256.
- 66. Higgins CM, Jung C, Xu Z. 2003. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. BMC Neurosci 4:16.
- 67. Huang H, Taraboletti A, Shriver LP. 2015. Dimethyl fumarate modulates antioxidant and lipid metabolism in oligodendrocytes. Redox Biol 5:169-175.
- Hubbs AF, Benkovic SA, Miller DB, O'Callaghan JP, Battelli L, Schwegler-Berry D, Ma Q. 2007. Vacuolar leukoencephalopathy with widespread astrogliosis in mice lacking transcription factor Nrf2. Am J Pathol 170:2068-2076.
- Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, Merino M, Trepel J, Zbar B, Toro J, Ratcliffe PJ, Linehan WM, Neckers L. 2005. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. Cancer Cell 8:143-153.

- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem Biophys Res Commun 236:313-322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes Dev 13:76-86.
- 72. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. 2001. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. FASEB J 15:1312-1314.
- Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. 2000. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A 97:10242-10247.
- 74. Juurlink BH, Thorburne SK, Hertz L. 1998. Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. Glia 22:371-378.
- 75. Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE. 2010. NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. Neuron 68:668-681.
- 76. Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE. 2013. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci 16:571-579.
- 77. Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, Polman CH, Schmierer K, Yousry TA, Yang M, Eraksoy M, Meluzinova E, Rektor I, Dawson KT, Sandrock AW, O'Neill GN, BG-12 Phase IIb Study Investigators. 2008. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. Lancet 372:1463-1472.
- Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brugger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA. 2007. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. Nat Genet 39:969-976.
- 79. Keifer J, O.P, O'Connor DM, Boulis NM. 2014. Gene and protein therapies utilizing VEGF for ALS. Pharmacology and Therapeutics 141:261-271.
- 80. Keyse SM, Tyrrell RM. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. Proc Natl Acad Sci U S A 86:99-103.
- 81. Khwaja O, Volpe JJ. 2008. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 93:F153-61.

- 82. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 377:942-955.
- Koivunen P, Hirsila M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J. 2007. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. J Biol Chem 282:4524-4532.
- 84. Kondo T, Raff M. 2000. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. Science 289:1754-1757.
- 85. Kraft AD, Johnson DA, Johnson JA. 2004. Nuclear factor E2-related factor 2dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. J Neurosci 24:1101-1112.
- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W. 2008. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. Brain 131:1749-1758.
- Kwiatkowski TJ,Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH,Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Science 323:1205-1208.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. 1996. Doseranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 347:1425-1431.
- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. 2003. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. Nat Genet 34:383-394.
- Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA. 2003. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. Nat Genet 33:366-374.
- 91. Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA. 2005. Nrf2, a multi-organ protector?. FASEB J 19:1061-1066.
- 92. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. Nature 487:443-448.

- Leigh PN, Abrahams S, Al-Chalabi A, Ampong MA, Goldstein LH, Johnson J, Lyall R, Moxham J, Mustfa N, Rio A, Shaw C, Willey E, King's MND Care and Research Team. 2003. The management of motor neurone disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 74 Suppl 4:iv32-iv47.
- 94. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246:1306-1309.
- 95. Levine JM. 1994. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. J Neurosci 14:4716-4730.
- 96. Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. 2001. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. Trends Neurosci 24:39-47.
- 97. Levison SW, Young GM, Goldman JE. 1999. Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. J Neurosci Res 57:435-446.
- Lin SX, Lisi L, Dello Russo C, Polak PE, Sharp A, Weinberg G, Kalinin S, Feinstein DL. 2011. The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. ASN Neuro 3:10.1042/AN20100033.
- Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, Zeng W, Hronowsky X, Buko A, Chollate S, Ellrichmann G, Bruck W, Dawson K, Goelz S, Wiese S, Scannevin RH, Lukashev M, Gold R. 2011. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. Brain 134:678-692.
- Linker RA, Lee D-, Stangel M, Gold R. 2008. Fumarates for the treatment of multiple sclerosis: Potential mechanisms of action and clinical studies. Expert Review of Neurotherapeutics 8:1683-1690.
- Lino MM, Schneider C, Caroni P. 2002. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. J Neurosci 22:4825-4832.
- 102. Litjens NH, Burggraaf J, van Strijen E, van Gulpen C, Mattie H, Schoemaker RC, van Dissel JT, Thio HB, Nibbering PH. 2004a. Pharmacokinetics of oral fumarates in healthy subjects. Br J Clin Pharmacol 58:429-432.
- 103. Litjens NH, van Strijen E, van Gulpen C, Mattie H, van Dissel JT, Thio HB, Nibbering PH. 2004b. In vitro pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters. BMC Pharmacol 4:22.
- 104. Lobsiger CS, Cleveland DW. 2007. Glial cells as intrinsic components of noncell-autonomous neurodegenerative disease. Nat Neurosci 10:1355-1360.
- 105. LoGerfo A, Chico L, Borgia L, Petrozzi L, Rocchi A, D'Amelio A, Carlesi C, Caldarazzo Ienco E, Mancuso M, Siciliano G. 2014. Lack of association between nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 promoter gene

polymorphisms and oxidative stress biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis patients. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2014.

- 106. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E, EURALS. 2010. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. J Neurol Neurosurg Psychiatry 81:385-390.
- 107. Louapre C, Lubetzki C. 2015. Neurodegeneration in multiple sclerosis is a process separate from inflammation: Yes. Multiple Sclerosis 21:1626-1628.
- 108. Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A, He W, Lin JH, Han X, Takano T, Wang S, Sim FJ, Goldman SA, Nedergaard M. 2007. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. J Neurosci 27:12255-12266.
- 109. MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, Watson DG, Gottlieb E. 2007. Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. Mol Cell Biol 27:3282-3289.
- 110. Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretzschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM, Trojanowski JQ. 2007. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. Ann Neurol 61:427-434.
- 111. Magnus T, Carmen J, Deleon J, Xue H, Pardo AC, Lepore AC, Mattson MP, Rao MS, Maragakis NJ. 2008. Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. Glia 56:200-208.
- 112. Mason JL, Langaman C, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK. 2001. Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. Neuropathol Appl Neurobiol 27:50-58.
- 113. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. EMBO J 20:5197-5206.
- 114. McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EM, Greensmith L. 2013. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. Biochim Biophys Acta 1832:1421-1436.
- 115. Mimoto T, Miyazaki K, Morimoto N, Kurata T, Satoh K, Ikeda Y, Abe K. 2012. Impaired antioxydative Keap1/Nrf2 system and the downstream stress protein responses in the motor neuron of ALS model mice. Brain Res 1446:109-118.
- 116. Miyamoto N, Maki T, Pham LD, Hayakawa K, Seo JH, Mandeville ET, Mandeville JB, Kim KW, Lo EH, Arai K. 2013. Oxidative stress interferes with white matter renewal after prolonged cerebral hypoperfusion in mice. Stroke 44:3516-3521.

- 117. Moreau C, Devos D, Brunaud-Danel V, Defebvre L, Perez T, Destee A, Tonnel AB, Lassalle P, Just N. 2006. Paradoxical response of VEGF expression to hypoxia in CSF of patients with ALS. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77:255-257.
- 118. Morland C, Henjum S, Iversen EG, Skrede KK, Hassel B. 2007. Evidence for a higher glycolytic than oxidative metabolic activity in white matter of rat brain. Neurochem Int 50:703-709.
- 119. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. 2007. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. Nat Neurosci 10:615-622.
- 120. Nagara Y, Tateishi T, Yamasaki R, Hayashi S, Kawamura M, Kikuchi H, Iinuma KM, Tanaka M, Iwaki T, Matsushita T, Ohyagi Y, Kira J. 2013. Impaired cytoplasmic-nuclear transport of hypoxia-inducible factor-1alpha in amyotrophic lateral sclerosis. Brain Pathol 23:534-546.
- 121. Nave KA. 2010a. Myelination and support of axonal integrity by glia. Nature 468:244-252.
- 122. Nave KA. 2010b. Myelination and the trophic support of long axons. Nat Rev Neurosci 11:275-283.
- 123. Nazarewicz RR, Dikalova A, Bikineyeva A, Ivanov S, Kirilyuk IA, Grigor'ev IA, Dikalov SI. 2013. Does scavenging of mitochondrial superoxide attenuate cancer prosurvival signaling pathways?. Antioxid Redox Signal 19:344-349.
- 124. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM-. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science 314:130-133.
- 125. Neymotin A, Calingasan NY, Wille E, Naseri N, Petri S, Damiano M, Liby KT, Risingsong R, Sporn M, Beal MF, Kiaei M. 2011. Neuroprotective effect of Nrf2/ARE activators, CDDO ethylamide and CDDO trifluoroethylamide, in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Free Radic Biol Med 51:88-96.
- 126. Niebroj-Dobosz I, Rafalowska J, Fidzianska A, Gadamski R, Grieb P. 2007. Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats. Folia Neuropathol 45:236-241.
- 127. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, Filip M. 2015. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. Mol Neurobiol.
- 128. Niehaus A, Stegmuller J, Diers-Fenger M, Trotter J. 1999. Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. J Neurosci 19:4948-4961.
- 129. Nishiyama A. 2007. Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS. Neuroscientist 13:62-76.

- 130. Nonneman A, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2014. The role of oligodendroglial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. Neurodegener Dis Manag 4:223-239.
- Okamoto K, Hirai S, Shoji M, Senoh Y, Yamazaki T. 1990. Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol 80:222-226.
- 132. O'Meara RW, Ryan SD, Colognato H, Kothary R. 2011. Derivation of enriched oligodendrocyte cultures and oligodendrocyte/neuron myelinating co-cultures from post-natal murine tissues. J Vis Exp (54). pii: 3324. doi:10.3791/3324.
- 133. Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. Nat Genet 28:131-138.
- 134. Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL. 1998. Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. Nat Genet 19:171-174.
- 135. Pasinelli P, Borchelt DR, Houseweart MK, Cleveland DW, Brown RH, Jr. 1998. Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15763-15768.
- 136. Pellerin L, Pellegri G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin J-, Stella N, Magistretti PJ. 1998. Evidence supporting the existence of an activitydependent astrocyte-neuron lactate shuttle. Dev Neurosci 20:291-299.
- 137. Peng H, Guerau-de-Arellano M, Mehta VB, Yang Y, Huss DJ, Papenfuss TL, Lovett-Racke AE, Racke MK. 2012. Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and extracellular signalregulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling. J Biol Chem 287:28017-28026.
- 138. Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haeck W, Staats K, Geelen V, Hersmus N, Kusters B, Van Den Bosch L, Van Damme P, Richardson WD, Robberecht W. 2013. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Brain 136:471-482.
- 139. Philips T, Robberecht W. 2011. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. Lancet Neurol 10:253-263.
- 140. Philips T, Rothstein JD. 2014. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol 262 Pt B:111-120.

- 141. Poss KD, Tonegawa S. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase 1deficient cells. Proc Natl Acad Sci U S A 94:10925-10930.
- 142. Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. 2006. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. Nat Neurosci 9:408-419.
- 143. Regenold WT, Phatak P, Makley MJ, Stone RD, Kling MA. 2008. Cerebrospinal fluid evidence of increased extra-mitochondrial glucose metabolism implicates mitochondrial dysfunction in multiple sclerosis disease progression. J Neurol Sci 275:106-112.
- 144. Renton A, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs J, Schymick J, Laaksovirta H, van Swieten J, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes A, Kaganovich A, Scholz S, Duckworth J, Ding J, Harmer D, Hernandez D, Johnson J, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro R, Orrell R, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen I, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister J, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls M, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita V-, Kaivorinne A-, Holtta-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wuu J, Chio A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein J, Sendtner M, Drepper C, Eichler E, Alkan C, Abdullaev Z, Pack S, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams N, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris H, Tienari P, Traynor B. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. Neuron 72:257-268.
- 145. Richter-Landsberg C, Heinrich M. 1996. OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. J Neurosci Res 45:161-173.
- 146. Rinholm JE, Hamilton NB, Kessaris N, Richardson WD, Bergersen LH, Attwell D. 2011. Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. J Neurosci 31:538-548.
- 147. Robberecht W, Philips T. 2013. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. Nat Rev Neurosci 14:248-264.
- 148. Rosen DR. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 364:362.
- 149. Rote Liste Service GmbH, http://online.rote-liste.de/suche/praep/25033 (02.05.2016).
- 150. Rotunno MS, Auclair JR, Maniatis S, Shaffer SA, Agar J, Bosco DA. 2014. Identification of a misfolded region in superoxide dismutase 1 that is exposed in amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem 289:28527-28538.
- 151. Saab AS, Tzvetanova ID, Nave KA. 2013. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. Curr Opin Neurobiol 23:1065-1072.

- 152. Sanchez-Abarca LI, Tabernero A, Medina JM. 2001. Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids. Glia 36:321-329.
- 153. Sasaki S, Warita H, Murakami T, Abe K, Iwata M. 2004. Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. Acta Neuropathol 107:461-474.
- 154. Sato K, Morimoto N, Kurata T, Mimoto T, Miyazaki K, Ikeda Y, Abe K. 2012. Impaired response of hypoxic sensor protein HIF-1alpha and its downstream proteins in the spinal motor neurons of ALS model mice. Brain Res 1473:55-62.
- 155. Satoh T, Harada N, Hosoya T, Tohyama K, Yamamoto M, Itoh K. 2009. Keap1/Nrf2 system regulates neuronal survival as revealed through study of keap1 gene-knockout mice. Biochem Biophys Res Commun 380:298-302.
- 156. Scannevin RH, Chollate S, Jung MY, Shackett M, Patel H, Bista P, Zeng W, Ryan S, Yamamoto M, Lukashev M, Rhodes KJ. 2012. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. J Pharmacol Exp Ther 341:274-284.
- 157. Schilling S, Goelz S, Linker R, Luehder F, Gold R. 2006. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. Clin Exp Immunol 145:101-107.
- 158. Schulze-Topphoff U, Varrin-Doyer M, Pekarek K, Spencer CM, Shetty A, Sagan SA, Cree BA, Sobel RA, Wipke BT, Steinman L, Scannevin RH, Zamvil SS. 2016. Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. Proc Natl Acad Sci U S A 113:4777-4782.
- 159. Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM. 1997. Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. Brain Res 774:221-224.
- 160. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. 2001. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. Mol Cell Biol 21:3436-3444.
- 161. Semenza GL. 2011. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 76:347-353.
- 162. Semenza GL. 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. Curr Opin Genet Dev 20:51-56.
- 163. Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 3:721-732.
- 164. Semenza GL, Wang GL. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 12:5447-5454.

- 165. Serra-Perez A, Planas AM, Nunez-O'Mara A, Berra E, Garcia-Villoria J, Ribes A, Santalucia T. 2010. Extended ischemia prevents HIF1alpha degradation at reoxygenation by impairing prolyl-hydroxylation: role of Krebs cycle metabolites. J Biol Chem 285:18217-18224.
- 166. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 359:843-845.
- 167. Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. J Cereb Blood Flow Metab 27:1766-1791.
- 168. Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. 1998. Presence of 4hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 44:696-699.
- 169. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. 1999. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. J Neurosci 19:5731-5740.
- 170. Sprissler J. Characterization of the Expression of the Pyruvat Dehydegenase Kinase 4 in the Central Nervous System in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Bachelorthesis, Universität Ulm (2016).
- 171. Sreedharan J, Brown RH, Jr. 2013. Amyotrophic lateral sclerosis: Problems and prospects. Ann Neurol 74:309-316.
- 172. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. 2001. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. FASEB J 15:2445-2453.
- 173. Sun YY, Wang CY, Hsu MF, Juan SH, Chang CY, Chou CM, Yang LY, Hung KS, Xu J, Lee YH, Hsu CY. 2010. Glucocorticoid protection of oligodendrocytes against excitotoxin involving hypoxia-inducible factor-1alpha in a cell-type-specific manner. J Neurosci 30:9621-9630.
- 174. Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS, Richardson DC. 1982. Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. J Mol Biol 160:181-217.
- 175. Talbot K. 2009. Motor neuron disease: the bare essentials. Pract Neurol 9:303-309.
- 176. Thiessen A, Schmidt MM, Dringen R. 2010. Fumaric acid dialkyl esters deprive cultured rat oligodendroglial cells of glutathione and upregulate the expression of heme oxygenase 1. Neurosci Lett 475:56-60.
- 177. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med 338:278-285.

- 178. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. Neurobiol Dis 15:601-609.
- 179. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. J Biol Chem 281:9030-9037.
- 180. Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA. 2008. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci 28:13574-13581.
- 181. Venci JV, Gandhi MA. 2013. Dimethyl fumarate (Tecfidera): a new oral agent for multiple sclerosis. Ann Pharmacother 47:1697-1702.
- 182. Venugopal R, Jaiswal AK. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 93:14960-14965.
- 183. Wang GL, Semenza GL. 1995. Purification and characterization of hypoxiainducible factor 1. J Biol Chem 270:1230-1237.
- 184. Werdenberg D, Joshi R, Wolffram S, Merkle HP, Langguth P. 2003. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. Biopharm Drug Dispos 24:259-273.
- 185. Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. 2002. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. J Neurochem 80:616-625.
- 186. Wierinckx A, Breve J, Mercier D, Schultzberg M, Drukarch B, Van Dam AM. 2005. Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells. J Neuroimmunol 166:132-143.
- 187. Wiesner D, Merdian I, Lewerenz J, Ludolph AC, Dupuis L, Witting A. 2013. Fumaric acid esters stimulate astrocytic VEGF expression through HIF-1alpha and Nrf2. PLoS One 8:e76670.
- 188. Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS. 2008. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. Proc Natl Acad Sci U S A 105:7594-7599.
- 189. Yan H, Rivkees SA. 2006. Hypoglycemia influences oligodendrocyte development and myelin formation. Neuroreport 17:55-59.
- Yuen TJ, Silbereis JC, Griveau A, Chang SM, Daneman R, Fancy SP, Zahed H, Maltepe E, Rowitch DH. 2014. Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. Cell 158:383-396.

- 191. Zhao G, Liu Y, Fang J, Chen Y, Li H, Gao K. 2014a. Dimethyl fumarate inhibits the expression and function of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). Biochem Biophys Res Commun 448:303-307.
- 192. Zhao Y, Matsuo-Takasaki M, Tsuboi I, Kimura K, Salazar GT, Yamashita T, Ohneda O. 2014b. Dual functions of hypoxia-inducible factor 1 alpha for the commitment of mouse embryonic stem cells toward a neural lineage. Stem Cells Dev 23:2143-2155.
- 193. Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE. 2007. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. Nat Neurosci 10:321-330.
- 194. Zuppinger K, Wiesmann U, Siegrist HP, Schafer T, Sandru L, Schwarz HP, Herschkowitz N. 1981. Effect of glucose deprivation on sulfatide synthesis and oligodendrocytes in cultured brain cells of newborn mice. Pediatr Res 15:319-325.

7. DANKSAGUNG

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

8. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.