

**Aus dem Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Arndt Rolfs**

Einfluß von Atorvastatin auf die Expression pathogenetisch relevanter Proteine in der EAE und in neuralen Progenitorzellkulturen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Veronica Antipova
aus Minsk, Weißrußland

Rostock 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0138-3

Dekan: **Prof. Dr. Emil Christian Reisinger**

1. Gutachter: **Prof. Dr. med. Arndt Rolfs** (Direktor des Albrecht-Kossel-Instituts für Neuroregeneration der Universität Rostock)
2. Gutachter: **Prof. Dr. med. Andreas Wree** (Direktor des Instituts für Anatomie der Universität Rostock)
3. Gutachter: **em. Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Wolfgang Kühnel** (Institut für Anatomie Universität zu Lübeck)

Tag der Verteidigung: 14.07.2009

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden publiziert:

- Antipova V., E. Mix, S.M. Ibrahim, I. Mazon-Pelaez, S. Vogler, D. Koczan, A. Glass, L. Gierl, M. Zschiesche, T. Böttcher, A. Wree, A. Rolfs
Effect of the HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin on protein expression of statin-responsive genes in experimental autoimmune encephalomyelitis.
Congress of Anatomists in Würzburg, Sept. 2005
Ann. Anat., Jena (im Druck)
- Mix E, S.M. Ibrahim, J. Pahnke, A. Glass, I. Mazon-Pelaez, S. Lemcke, D. Koczan, U. Gimsa, S. Bansemer, Th. Scheel, Th. Karopka, T. Böttcher, J. Müller, E. Dazert, V. Antipova, R. Hoffrogge, A. Wree, M. Zschiesche, U. Strauß, G. Kundt, R. Warzok, L. Gierl, A. Rolfs
3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor Atorvastatin mediated effects depend on the activation status of target cells in PLP-EAE.
Journal of Autoimmunity, 27(4), (2006), p. 251-265

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Multiple Sklerose und experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis	1
1.1.1. Multiple Sklerose	1
1.1.2. Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE)	5
1.2. Statine	9
1.3. Statin-sensitive Proteine	11
1.4. Statine und Neurogenese / neurale Vorläuferzellen	24
1.5. Fragestellung	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Untersuchungen in der EAE	31
2.1.1. Induktion und klinische Beurteilung der EAE	31
2.1.2. Behandlung mit Atorvastatin	31
2.1.3. Präparation von Lymphknoten und Rückenmark	32
2.1.4. RNA-Isolierung aus Lymphknoten und Rückenmark	32
2.1.5. Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix-Mikroarray-Technik	33
2.1.6. Proteinextraktionen aus Lymphknoten und Rückenmark	34
2.1.7. Western-Blot (Odyssey-System)	35
2.2. Untersuchungen in der Zellkultur	36
2.2.1. Kultivierung der striatalen Vorläuferzellen der Ratte ST14A	36
2.2.2. Zellvitalitätsbestimmung mittels Nissl-Färbung	37
2.2.3. In-Zell-Western-Analyse	40
2.3. Statistik	43

3. Ergebnisse	44
3.1. Statineffekte in der EAE in vivo	44
3.1.1. Genexpression (Mikroarray-Analyse)	44
3.1.2. Proteinexpression (Western-Blot-Analyse)	46
3.2. Statineffekte auf die neurale Vorläuferzelllinie ST14A in vitro (In-Zell-Western-Analyse)	53
3.2.1. Vitalität von ST14A-Zellen nach Statinexposition	53
3.2.2. Basale Expressionskinetik Statin-sensitiver Proteine in ST14A- Zellen	58
3.2.3. Statineffekt auf die Proteinexpressionskinetik in ST14A-Zellen	64
4. Diskussion	77
4.1. Diskussion des Tiermodells der EAE und seiner Beeinflussung durch Statine	77
4.2. Diskussion der quantitativen Western-Blot-Methode	80
4.3. Diskussion der Western-Blot-Ergebnisse im EAE-Modell	81
4.4. Diskussion der In-Zell-Western-Ergebnisse an ST14A-Zellen	85
4.5. Ausblick	99
5. Zusammenfassung	101
6. Literaturverzeichnis	104
7. Thesen	137
8. Persönliche Angaben und Dank	139
8.1. Danksagung	139
8.2. Erklärung	140
8.3. Lebenslauf	141
8.4. Publikationen	142
9. Anhang	1
9.1. Anhang A (Materialien)	1
9.2. Anhang B (Ergebnisse: Originaldaten)	8

Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
Abb	Abbildung
ADAMTS	Familie der Metalloproteinasen
AIH	Autoimmun-Hepatitis
AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
B7-1	CD80 Molekül (Ligand für CD28)
B7-2	CD86 Molekül (Ligand für CD28)
CAR-3	Carboanhydrase-3
CCL-11	Chemokin (C-C motif) Ligand 11
CD	Cluster of differentiation
CD3	Ein Erkennungsmolekül auf der Oberfläche von T-Lymphozyten
CD4	Protein in der Zellmembran von T-Helferzellen
CD8	Protein in der Zellmembran von zytotoxischen T-Zellen
CD11	α -Subeinheit unterschiedlicher Integrine
CD20	Ein nicht-glykosyliertes Phosphoprotein auf der Oberfläche von reifen B-Zellen
CD28	Rezeptor für B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) Moleküle
CD40	Kostimulierendes Protein auf APZ
CD54	ICAM-1 (Intercellular cell adhesion molecule-1)
CD79	Transmembranes Protein, das einen Komplex mit Rezeptoren von B-Zellen bildet
CD80	Kostimulierendes Molekül für T-Zellaktivierung und -überleben (= B7.1)
CD83	Transmembranes Glykoprotein der Ig-Superfamilie
CD86	Kostimulierendes Molekül für T-Zellaktivierung und -überleben (= B7.2)
CE	Coefficient of error
CFA	Freunds Adjuvans
CNV	Choroidale Neovaskularisation
ConA	Concanavalin A (Mitogen)
COX	Cyclooxygenase
CSF	Cerebrospinal fluid, Liquor cerebrospinalis
CTLA-4	Cytotoxisches T-Lymphozytenantigen-4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-bindende-Domäne	Proteindomäne
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraazetat

VII

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Proteinkinase
ESr	Erythrozytensedimentationsrate/Blutsenkungsgeschwindigkeit
ESZ	Embryonale Stammzellen
Exp	Experiment
FBS	Fetal bovine serum
FM3a-Zelllinie	Mammakarzinomzellen der C3H-Maus
FPP	Farnesylpyrophosphat
GATA	Familie von Transkriptionsfaktoren, die an die Sequenz GATA binden
GDP	Guanosindiphosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GLAT	Glatiramerazetat, synthetisches Oligopeptid
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein (GTP-bindendes Protein)
GPZ	Gliale Progenitorzellen
x g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
HDL	High Density Lipoprotein
HMGCR	HMG-CoA-Reduktase
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
H-Ras	Harvey-Ras (kleine GTPase)
HSP	Hitze-Schock-Protein
HUVEC	Humane umbilikale Endothelzellen
H2 (PGH2)	Prostaglandin, das Produkt der Oxydation von Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVIg	Intravenöse Immunglobulin
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kD	Kilodalton
K-Ras	Kirsten-Ras (kleine GTPse)
LDL	Low density lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LIF	Leukemia inhibitory factor
LK	Lymphknoten
LOX	Lipoxygenase
MAC-1	Glykoprotein (Integrin α M, CD11b)
MAG	Myelinassoziiertes Glykoprotein
MAP	Mitogen-activated protein (Mitogen-aktiviertes Protein)
MAS	Microarray Suite (der Fa. Affymetrix)
MBP	Myelin-basisches Protein

VIII

MCP	Monocyte chemotactic protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MRI	Magnetic Resonance Imaging
mRNA	Messenger-RNA
MS	Multiple Sklerose
NCAM	Neural cell adhesion molecule
n.d.	Nicht durchgeführt
NF-κB	Nukleärer Faktor κB, Transkriptionsfaktor
NGF	Nerve growth factor
n.i.	Nach Immunisierung
NO	Nitric Oxide
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
NP1	Neuronal Pentraxin-1
NP2	Neuronal Pentraxin-2
NPZ	Neurale Progenitorzellen
N-Ras	Neuroblastoma-Ras
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NSZ	Neurale Stammzellen
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline – Tween 20
PFA	Paraformaldehyd
PI3-K/PKB	Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B
PLP	Proteolipid-Protein
PP	Pyrophosphat
P-STAT-6	Phosphorylated STAT-6 (Signal transducer and activator of transcription)
PTX-3	Pentraxin-3
Rab	(“Ras-related in brain”), Guaninnukleotidbindendes Protein
Rac	Guaninnukleotidbindendes Protein
Rap	Spezifische Guaninnukleotidbindendes Protein
Ras	(<i>Rat sarcoma</i>), Guaninnukleotidbindendes Protein, (Proto-Onkogen)
Rho	Guaninnukleotidbindendes Protein
RhoA	Mitglied der Rho-Familie A
RhoB	Mitglied der Rho-Familie B
RM	Rückenmark
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
RR	Rezidivierend-remittierende Form der MS
RT	Raumtemperatur
SAP	Serumamyloid-Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2-Domäne	Src-homology2 (Proteindomäne)
SOCS	Suppressor der Zytokinsignale
STAT	Signal transducer and activator of transcription

IX

Std	Stunde
ST14A	Immortalisierte, striatale Progenitorzelllinie aus Rattenembryonen 14 Tage p.c.
SV40	Simian-Virus 40
S100-A4	Ca ⁺⁺ -binding protein
TGF	Transforming Growth Factor
TH	Tyrosinhydroxylase
Th0	Subpopulation der T-Helfer Zellen 0
Th1	Subpopulation der T-Helfer Zellen 1
Th2	Subpopulation der T-Helfer Zellen 2
TNF	Tumor necrosis factor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	Thrombospondin (extracellular matrix protein)
Triton X-100	4-Tetramethylbutylphenyldecaetylglycolether
T-Zellen	T-Lymphozyten
WB	Western-Blot
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1 (auch als CD106 bezeichnet)
VLA-4	Very late antigen-4 (Integrin $\alpha\beta 1$)
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis Volumen pro Volumen
vWF	Von-Willebrand-Faktor, ein Serumglykoprotein
ZD	Zelldichte
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose und experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis

Die experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) ist eine organspezifische durch Zellen vermittelte autoimmune demyelinisierende Krankheit des zentralen Nervensystems (ZNS). Gleichartigkeiten zwischen der Multiplen Sklerose (MS) und der EAE sind auf vielen Ebenen vorhanden (Steinman 2003; Steinman and Zamvil 2005). Die EAE hat eine vergleichbare Symptomatik und zeigt ähnliche morphologische Veränderungen wie die MS, so dass sie als wichtigstes tierexperimentelles Modell der MS gilt und als bestes verfügbares Tiermodell zum Studium demyelinisierender Krankheiten im menschlichen ZNS angesehen werden kann.

1.1.1. Multiple Sklerose

Synonyme: Enzephalomyelitis disseminata, chronisch disseminierte Enzephalomyelitis, demyelinisierende Enzephalomyelitis, Entmarkungsenzephalomyelitis, Polysklerose, sclerosis multiplex, disseminierte Sklerose, sclerose en plaque, Polysklerose, Morbus Charcot.

Die MS ist die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren und eine die bedeutendste Autoimmunerkrankung des ZNS. Die Krankheit betrifft Frauen doppelt so oft wie Männer, wobei die Ursachen dieser Geschlechtsunterschiede unklar sind (Steinman 1993, 2001; Whitacre 2001; Steinman et al. 2002). Weltweit gibt es ca. 2 Millionen Erkrankte, davon ca. 350.000 Fälle in Nordamerika und ca. 100.000 in Deutschland (Prävalenz: etwa 1:1.000). Die MS tritt in der weißen Bevölkerung häufiger auf als in anderen ethnischen Gruppen. Besonders hoch ist die Inzidenz in Kaukasien, niedriger dagegen in Indien, Japan, Südostasien, Zentralafrika und in Teilen Russlands (Kurtzke 2000; Hemmer et al. 2002). Selbst innerhalb Deutschlands gibt es unterschiedliche Inzidenzen. Am häufigsten findet man die Erkrankung in Südniedersachsen und im Ruhrgebiet.

Die Krankheit beginnt in der Regel im jüngeren Erwachsenenalter mit Entzündungen in der weißen Hirnsubstanz, die zum Verlust von Sinnesempfindungen und zu Einschränkungen der Beweglichkeit führen (Steinman 1993). Die MS ist in ihrem Verlauf sehr heterogen, meist jedoch eine „Multiphasenkrankheit“ (Steinman 2001), die bei einem Teil der Patienten zu schwerwiegenden Behinderungen führt (Gold et al. 2005). Mehr als 80% der Patienten entwickeln eine rezidivierend-remittierende (schubförmige) Form (RRMS). Etwa 10 Jahre nach Krankheitsbeginn geht bei ca. 50% der Patienten die schubförmige Form in eine

sekundär-progressive MS über (Lublin and Reingold 1997). Ca. 10% der Patienten, gewöhnlich ältere Jahrgänge, weisen eine primär-progressive Form der MS mit stetig zunehmender Verschlechterung des Krankheitsbildes auf. Diese Patienten sind besonders schwer therapierbar.

Die erste klinische Beschreibung der Erkrankung geht auf Charcot (1868) zurück. Er beschrieb bereits die drei klassischen MS-Symptome Nystagmus, Intentionstremor und skandierende Sprache. Auf Grund des variablen Krankheitsverlaufs haben einzelne „Schulen“ bis zu sieben verschiedene Verlaufsformen unterschieden. Außerdem gibt es zwei Sonderformen der MS, die **benigne MS**, bei der die Patienten noch 15 Jahre nach Beginn der Krankheit wenig beeinträchtigt sind, und die **maligne MS** mit progredientem Verlauf, die in kurzer Zeit zu signifikanter Behinderung des Patienten führt.

Symptome

Zu den Hauptsymptome der MS gehören: plötzliche Sehstörungen, Muskelschwäche, Schwindel, Lähmungen verschiedener Extremitätenbereiche, Gefühlsstörungen, Koordinationsstörungen, Sprachstörungen, Schluckstörungen, unwillkürliche Augenbewegungen, Störungen der Harnwege (Inkontinenz) und Verdauungsorgane, Schmerzen, Störungen der Sexualfunktion, Einschränkungen von Konzentration und geistiger Leistungsfähigkeit, leichte Ermüdbarkeit, Gedächtnisstörungen, Depression.

Ätiologie und Pathogenese

Obwohl die Ätiologie der MS noch weitgehend unbekannt ist, stützt eine Reihe neuer Forschungsergebnisse die Hypothese, dass die MS nicht ausschließlich eine immunologisch verursachte Erkrankung ist, sondern dass auch neurodegenerative Vorgänge an der Pathogenese entscheidend beteiligt sind (Kleinschmitz et al. 2007).

Eine Reihe von ursächlichen Faktoren wird seit der klassischen Beschreibung der Krankheit durch Charcot (1868) diskutiert. Die MS ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der auch Umwelt- und genetische Faktoren intervenieren (Ramagopalan et al. 2008; Weber and Zamvil 2008). Als Auslöser der in den meisten Fällen nachweisbaren Autoimmunreaktion werden Chlamydia pneumoniae und Viren diskutiert (Derfuss et al. 2001; Tejada-Simon et al. 2003; Kuusisto et al. 2007).

Die Pathogenese der MS besteht aus einem breiten Spektrum Krankheitsrelevanter Prozesse (Hemmer et al. 2002; Zamvil and Steinman 2003). Nach klinischen, pathologischen, immunologischen und tierexperimentellen Studien haben sich in den letzten Jahren neue Aspekte für die MS-Pathogenese ergeben (Hemmer et al. 2002). Zahlreiche Angaben

sprechen für eine Autoimmunerkrankung (Arnason 1983; Raine 1984; Martin et al. 1992), weil die Entzündungsinfiltrate T- und B-Lymphozyten enthalten (Hauser et al. 1986; Esiri and Gay 1997). Auch spielt eine genetische Empfänglichkeit, verbunden mit MHC-Klasse-II-Genen, dabei eine Rolle (Oksenberg and Hauser 2005).

Die MS ist durch eine Demyelinisierung im ZNS und durch Plaques (Infiltrate) von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gekennzeichnet. Die Daten von Delgado and Sheremata (2006) zeigen, dass myelin-spezifische CD8⁺ T-Zellen als Effektorzellen in der MS-Pathogenese wirksam sein können. Aus dem Blut von MS-Patienten lassen sich T-Zellen gegen myelin-spezifische Antigene, wie basisches Myelinprotein (MBP) und Proteolipid-Protein (PLP) isolieren. Für diese Autoantigene können spezifische „immundominante“ T-Zell-Epitope charakterisiert werden (Ota et al. 1990; Pette et al. 1990; Gold et al. 2005). Für die Entzündung bei der MS wird die Infiltration von autoimmunen CD4⁺ T-Lymphozyten vom Th1-Subtyp verantwortlich gemacht. Durch die Verschiebung der Balance zwischen „pathogener Th1-Antwort“ und „regulatorischer Th2-Antwort“ lässt sich die Erkrankungsaktivität beeinflussen (Gold et al. 2005; Linker et al. 2005).

MS und Neurodegeneration

Der Ablauf der MS-Pathogenese besteht aus Entzündungs- und neurodegenerativen Phasen (Steinman 2001). Charakteristisch sind entzündliche Läsionen im ZNS mit sekundärer Demyelinisierung und variablem Verlust an Axonen und Gliazellen. Zusätzlich zur axonalen Schädigung kommen auch direkte Läsionen der Nervenzellen vor (Linker et al. 2005; Gold and Brück 2007). Die unlängst erfolgte detaillierte histopathologische Klassifizierung von humanen MS-Läsionen zeigte, dass diese morphologisch auffallend heterogen sind (Lucchinetti et al. 2000). Demnach kann man MS-Plaques in 4 verschiedene Muster einteilen (Lassmann et al. 2001; Kleinschnitz et al. 2007). Zelluläre Elemente (Makrophagen, aktivierte Mikroglia, T-Zellen) und humorale Bestandteile des Immunsystems (Antikörper, Komplement) sind überwiegend bei den Läsionen der Muster I und II gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu sind die Läsionen vom Muster III und IV überwiegend durch die primäre Oligodendrozytenpathologie mit wenig Entzündung charakterisiert. Muster-III-Läsionen remyelinisieren praktisch nicht und ähneln den histologischen Veränderungen nach einem hypoxischen oder toxischen Hirnschaden. Die Muster-IV-Läsionen unterscheiden sich von denen des Muster III durch vermehrte Apoptose der Oligodendrozyten aufgrund metabolischer Störungen (Kleinschnitz et al. 2007). Die MS-Pathologie wurde zuerst von Charcot umfassend beschrieben (siehe bei Ludwin 2000; Lucchinetti et al. 2005). Zu den prominenten Charakteristika zählen „shadow plaques“, die zuerst Otto Marburg 1906

beschrieb (Patrikios et al. 2006). Die Demyelinisierung ist ebenfalls seit 1864 bekannt und stellt ein konstantes Phänomen der MS dar (Prineas et al. 1993; Raine and Wu 1993). Die Plaques befinden sich meist in der weißen Substanz mit Ausbreitung in die graue Substanz und kommen in beiden Großhirnhemisphären sowie im Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark vor. Im Anschluss an eine autoimmun-entzündlichen Phase kommt es zu einer selektiven Demyelinisierung von Axonen. Dieser folgt nach mehreren Jahren eine neurodegenerative Phase mit Verlusten von Axonen und Neuronen (Steinman 2001). Die modernen Behandlungsstrategien dieser neurodegenerative Komponente sollen u.a. die eingetretenen Gewebeschäden reparieren. Daraus leitet sich ab, dass therapeutische Interventionen, z.B. mit Statinen, möglichst auch eine neuroprotektive bzw. neuroregenerative Wirkung entfalten sollten.

Therapie der MS

Bis ca. 1990 waren die Corticosteroide eines der einzig wirksamen Therapieverfahren der MS. Die heutigen Therapieansätze bei der MS richten sich nach dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Als klassische MS-Therapie kann man gegenwärtig folgende Verfahren und Präparate nennen:

1. Für die immunmodulatorische Therapie: (a) Interferon- β (IFN- β -1a und IFN- β -1b)-Präparate (Neuhaus et al. 2005a) oder (b) Glatirameracetat (GLAT) – ein synthetisches Oligopeptid, das aus den vier Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin, L-Tyrosin besteht (Gold et al. 2001, 2005; Ruggieri et al. 2008).
2. Eine Basistherapie der zweiten Wahl sind (a) Azathioprin oder (b) intravenöse Immunglobuline (IVIg) (Lewanska et al. 2002; Stangel and Gold 2004). In der Therapie der Multiplen Sklerose haben IVIg derzeit eher den Stellenwert eines Reservepräparates und werden in Einzelfällen, postpartal und während der Stillzeit benutzt (Cursiefen and Mäurer 2008).
3. Für die eskalierende Immuntherapie wird Mitoxantron empfohlen, das für die schubförmig-remittierende und die sekundär-progrediente MS geeignet ist (Gonsette 1996; Weilbach et al. 2004).

Alternative und symptomatische Verfahren eignen sich als ergänzende Therapie (Schwendimann 2006).

Die Effektivität der unterschiedlichen MS-Therapieverfahren basiert meist auf der Beurteilung morphologischer Veränderungen des Gehirns und des Rückenmarks; daneben wird als klassisches klinisches Kriterium der Therapieeffektivität und des

Therapiemonitorings unverändert meist die „Expanded Disability Status Scale“ (EDSS) nach Kurtzke (Kurtzke, 1983) verwendet.

Neue Therapieansätze sollten vor der Einführung in die Klinik in Tiermodellen erprobt werden, die möglichst viele Aspekte der menschlicher Erkrankung imitieren. Für die MS steht ein optimales Tiermodell, u.a. wegen der unterschiedlichen Pathomechanismen und Verlaufsformen der Erkrankung, noch nicht zur Verfügung. Die größte Annäherung an die Pathogenese und Symptomatik wird derzeit mit Tiermodellen der EAE erreicht, die in verschiedenen Modifikationen zur Erforschung einzelner Pathomechanismen und Therapieprinzipien der unterschiedlichen MS-Typen eingesetzt werden.

1. 1. 2. Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE)

Während der letzten 30 Jahre ist die Zahl der EAE-Publikationen erheblich angestiegen, die „Medline“ weist in der Zeit von 1970 bis 1980 678 Artikel, von 1990 bis 2000 1 860 Artikel, und seit 2001 ca. 1600 Artikel auf (Sriram and Steiner 2005). Die Verwendung der EAE für die Entwicklung neuer Strategien der MS-Therapie spielt eine zentrale Rolle in der MS-Forschung (Martin and McFarland 1996; Steinman 1999).

Ähnlich sind sich EAE und MS hinsichtlich einer genetischen Assoziation zum Major Histocompatibility Complex (MHC) (vgl. auch Tabelle 1). Außerdem wurden bei beiden Krankheiten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in den Läsionen gefunden. Jedoch dominieren in den meisten EAE-Läsionen die $CD4^+$ T-Zellen, wohingegen in MS-Läsionen die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen eine ähnliche Relevanz besitzen. Die typischen Merkmale der EAE sind: Infiltrationen des Hirnparenchyms, perivaskuläre Leukozytenansammlungen sowie nachfolgende Demyelinisierung im ZNS.

Tabelle 1. Ähnlichkeiten zwischen EAE und MS.

Merkmal	EAE	MS
Genetische Besonderheiten	Assoziation zu MHC II-Antigenen	Assoziation zu MHC II-Antigenen
Umgebungsbedingter Auslöser	Rezidiv bei früher Infektion	Verbindung mit früher Infektion
Weiße Substanz	Th1-Zellen, B-Zellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, Antikörper gegen Myelin	Th1-Zellen, B-Zellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, Antikörper gegen Myelin
	Klonale $CD4^+$ und $CD8^+$ T-	Klonale $CD4^+$ und $CD8^+$ T-

	Zellen, reaktiv für Myelin-Komponenten Makrophagen, Mikroglia, $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, Komplement	Zellen reaktiv für Myelin-Komponenten Makrophagen, Mikroglia, $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, Komplement
Graue Substanz	Axonale Degeneration	Axonale Degeneration
Klinischer Befund	Neuritis opticus, Myelitis, Entzündung der periventrikulären weißen Substanz	Neuritis opticus, Myelitis, Entzündung der periventrikulären weißen Substanz
Klinische Formen	Rezidivierend-remittierende Form, progressiver Verlauf	Rezidivierend-remittierende Form, progressiver Verlauf

Das Konzept der Injektion von Proteinen in das ZNS zur Erzeugung einer autoimmunologisch bedingten Entzündung stammt aus dem Beginn des 20. Jahrhunderts, als Koritschoner und Schweinburg (1925) die Rückenmarksentzündung von Kaninchen durch Immunisierung mit menschlichem Rückenmarksgewebe induzierten. Mitarbeiter der Rockefeller-Universität (Rivers et al. 1933) haben 1930 das EAE-Tiermodell bei Affen durch die intramuskuläre Injektion von Hirnextrakt in das ZNS erzeugt. Das Verfahren wurde von von Ferraro and Jervis (1940) später reproduziert. Durch Zugabe von kompletten Freund's Adjuvans (CFA) (Freund and Bonato 1944), das aus *Mycobacterium tuberculosis* und Mineral-Öl besteht, wurde die akute disseminierte Enzephalomyelitis bei Affen (Morgan 1947), bei Kaninchen (Morrison 1947) und bei Meerschweinchen erzeugt (Freund et al. 1947). Später wurden gleichartige Ergebnisse bei Ratten, Mäusen, Katzen, Hunden, Schafen, Ziegen, Schweinen und Hühnchen erhalten (Waksman and Adams 1955). Das CFA induziert eine stabile Entzündungsreaktion sowie zahlreiche immunmodulatorische Effekte (Billiau and Matthys 2001).

In den letzten 75 Jahren wurden verschiedene Varianten der EAE entwickelt. Die Abkürzung „EAE“ wurde für die „experimentelle allergische Enzephalomyelitis“ eingeführt und steht heute für „experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis“. EAE-Varianten sind: die Opticus-Neuritis (Bettelli et al. 2003; Steinman 2003), die rezidivierende EAE (Brown and McFarlin 1981; Zamvil et al. 1985; Brocke et al. 1996) und die progressive MS (Lublin et al. 1981). In jüngster Zeit werden auch transgene EAE-Modelle benutzt (Ellmerich et al. 2005).

Derzeit unterscheidet man drei Hauptformen der EAE: die akute EAE, die hyperakute EAE und die chronisch-rekurrierende EAE (Pender 1995).

Akute EAE

Eine akute EAE kann durch die Immunisierung mit homogenisiertem ZNS-Gewebe, gereinigtem ZNS-Myelin oder spezifischen ZNS-Myelin-Antigenen mit CFA ausgelöst werden (Pender 1995). Folgende Proteine können als Antigen injiziert werden: MBP, PLP, myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), myelin-associated glycoprotein (MAG), myelin oligodendrocyte basic protein.

Hyperakute EAE

Einer sehr kurzen latenten Periode folgt ein rascher klinischer Verlauf mit hoher Mortalität. Die hyperakute EAE wird bei Rhesus-Affen durch die Immunisierung mit menschlichem Rückenmarksgewebe und CFA (Ravkina et al. 1979) sowie bei Lewis-Ratten durch Immunisierung mit einer Mixtur aus Homogenaten des Rückenmarks sowie Pertussis-Vakzinen induziert (Levine und Wenk 1965).

Chronisch-rekurrierende EAE

Bei dieser Erkrankungsform werden periodische klinische Attacken beobachtet. Bei Hartley-Meerschweinchen wird diese Erkrankung durch die Immunisierung mit homogenisiertem Rückenmarksgewebe und CFA induziert (Wisniewski and Keith 1977). Es finden sich bzgl. der Pathologien zahlreiche Ähnlichkeiten zwischen EAE und MS (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2. Vergleich zwischen EAE und MS (entnommen aus Sriram and Steiner 2005).

Pathologie	EAE	MS
Lokalisation der Demyelinisierung	Überwiegend perivenöse Myelinschäden im Rückenmark und Gehirn	Demyelinisierung nicht auf weiße Substanz beschränkt. Bei fehlender Entzündung intensive Demyelinisierung im zerebralen Cortex
Lokalisation von Läsionen	Abhängig vom Antigen, das zur Induktion benutzt wurde, dominierende Entzündung in der Lumbalregion bei MBP- und PLP-EAE und im Hirnstamm bei MOG-EAE	Perivaskuläre Areale in Hirnrinde, Hirnstamm, N. opticus und zervikalem Rückenmark; weniger Läsionen in den thorakalen und lumbalen Regionen
Phänotyp der zellulären Infiltrate	CD4 ⁺ T Zellen (MBP- und PLP-EAE). Aktivierte Makrophagen und einige CD8 ⁺ T-Zellen	Aktivierte Makrophagen und CD8 ⁺ T-Zellen aus limitierten Klonen
Zytokin-Dominanz	TH1-Bias in MBP- und PLP- EAE	Variable, unklare Zytokin-Dominanz

CSF-Immunologie	Antikörper für vorhandene Myelin-Antigene im CSF	Seltene und unklare Antigen-Spezifität von oligoklonalen Banden
IFN- γ -Therapie-Effekt	Abhängig vom Applikationsweg, kann sich EAE verschlechtern oder verbessern	Verschlechterungen abhängig von Ausmaß der Entzündungsläsionen
IFN- β	Variabel; kann EAE verschlechtern	Minderung der Frequenz von Rezidiven, deutlicher Verzögerungseffekt auf Progression
Anti-TNF Antikörper	Kann EAE abmildern	Verschlechterung der MS
Anti-VLA-4 Antikörper	Kann EAE abmildern	Senkung von Rezidiven; Effekt auf Progression ist nicht bekannt
Anti-CD4 Antikörper	Heilung der EAE	Kein Beweis für klinische Wirkung auf Rezidive oder Progression

Therapie der EAE und der MS

Viele therapeutische Substanzen, die erfolgreich bei der EAE appliziert wurden, sind auch in der Klinik für die MS-Behandlung wirksam (Tabelle 3) (Steinman and Zamvil 2005; Luccarini et al. 2008). Zu diesen Präparaten gehören u. a. die Statine (Stanislaus et al. 2001; Youssef et al. 2002; Greenwood et al. 2003; Vollmer et al. 2004; Luccarini et al. 2008; Paul et al. 2008). Die meisten Kenntnisse über mögliche Wirkungsmechanismen der Statine auf Autoimmunkrankheiten stammen aus Experimenten im EAE-Modell (Zamvil and Steinman 1990; Martin et al. 1992; Pahan et al. 1997; Stanislaus et al. 1999, 2001; Weber et al. 2007b,c). Außerdem kann eine Kombinations-Therapie von Statinen mit anderen immunomodulatoren bei der EAE und bei der MS effektiv sein (Stüve et al. 2006; Luccarini et al. 2008; Paintlia et al. 2008b).

Tabelle 3. Therapie der EAE und der MS.

Präparat	EAE	Wirkungsamkeit in MS
Glatirameracetat	+	Bewährt sich bei rezidivierend-remittierender MS und verringert die Rezidivrate um 30% (Sela 1999; Ruggieri et al. 2007, 2008; Schrempf and Ziemssen 2007; Weber et al. 2007a; Ziemssen and Schrempf 2007; Vollmer et al. 2008)
IFN- β	+	Bewährt sich bei rezidivierend-remittierender MS und verringert die Rezidivrate um ca. 30% (Feldman and Steinman 2005; Bosca et al. 2008; Kohriyama et al. 2008)
Statine	+	Reduzieren in klinischen Studien die MS-Symptome (Sena et al. 2003; Nath et al. 2004; Paul et al. 2008; Weber and Zamvil 2008)

1.2. Statine

Die 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer, Statine genannt, sind effektive cholesterinsenkende Agentien, die hauptsächlich für die Behandlung von Hypercholesterinämie benutzt werden (Maron et al. 2000; Weber and Zamvil 2008). Sie senken den Serumspiegel des Gesamtcholesterins im Blut um 15-40%, des Lipoproteins niedriger Dichte (LDL) um 20-60% und der Triglyceride um 10-30%; sie erhöhen die Konzentration des Lipoproteins höherer Dichte (HDL) (LaRosa et al.1999; Hartman 2001). Das Enzym HMG-CoA-Reduktase katalisiert die Konversion von HMG-CoA in L-Mevalonate, ein wichtiges Zwischenprodukt in der Cholesterin-Biosynthese (Ginsberg 1998; Weber and Zamvil 2008).

Die vorteilhaften Wirkungen der Statine basieren auf ihrer Fähigkeit die Cholesterin-Biosynthese zu reduzieren, worauf auch die positiven Effekte bei der Prävention und Behandlung der Alzheimerkrankheit (Hartman 2001; Kivipelto et al. 2006; Sparks et al. 2006; Pregelj 2008), Demenz (Wolozin et al. 2007; Bar-On et al. 2008) und Schlaganfall und evtl. auch der MS beruhen dürften (Stüve et al. 2003a,b; Crisby 2006; Reiss and Wirkowski 2007). Sie vermindern das Schlaganfallrisiko um ca. 25-30% (Endres et al. 1998; Collins et al. 2004; Amarenco et al. 2006). Statine reduzieren die Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen um bis zu 30% (Neuhaus et al. 2004; Topol 2004; Menge et al. 2005; Molokhia et al. 2008).

Statine haben auch ein breites Spektrum an pleiotropen Wirkungen in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben (Corsini et al. 1993; Grunler et al. 1994; Takemoto and Liao 2001). Hierzu gehören außer der Inhibition der HMG-CoA-Reduktase (Bellosta et al. 2000; Lansberg 2008; Shaw et al. 2008), die Inhibition der Expression und Sekretion von Entzündungszytokinen (Pahan et al. 1997; Stanislaus et al. 1999), die Hemmung der Lymphozytenmigration (Neuhaus et al. 2002), die Inhibierung der T-Zellen Aktivierung und Proliferation (Aktas et al. 2003; Waiczies et al. 2005), sowie die Hemmung von Adhäsionmolekülen (Weitz-Schmidt et al. 2004). Diese pleiotropen Effekte lassen sich im Wesentlichen durch den Effekt auf den L-Mevalonate-Signalweg erklären (Liao 2002; Davignon and Leiter 2007). Die Statine haben auch immunmodulatorische Wirkungen, sie können die Behandlung von unterschiedlichen Entzündungen unterstützen und daher auch für die Behandlung von Entzündungskrankheiten nützlich sein (Youssef et al. 2002; Zamvil and Steinman 2002; Neuhaus et al. 2005b; Weber et al. 2007b,c). Über die anti-neoplastischen Wirkungen der Statine haben verschiedene Autoren (Chan et al. 2003; Jakobisiak and Golab 2003; Topol 2004; Willerson and Ridker 2004) berichtet.

Das in der klinischen Praxis am häufigsten verwendete Statin ist Atorvastatin (Abb.1).

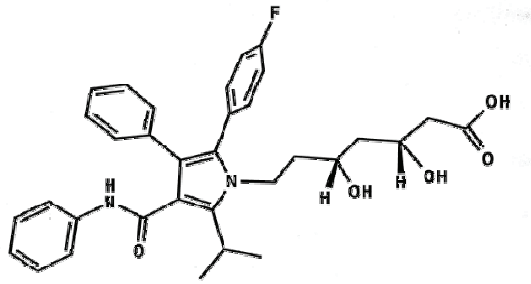


Abb. 1 Die Strukturformel von Atorvastatin.

Atorvastatin (Lipitor; Pfizer) gehört zu den synthetischen Statinen (Istvan and Deisenhofer 2001; Neuhaus et al. 2003, 2005b). Die absolute Bioverfügbarkeit von Atorvastatin beträgt etwa 12% und die inhibitorische Aktivität auf die HMG-CoA-Reduktase etwa 30% (Koytchev et al. 2004). Atorvastatin ist das zurzeit stärkste Statin auf dem deutschen Markt (Ishikawa et al. 2006).

Statine und Multiple Sklerose

In den letzten 10 Jahren wurden für die MS-Behandlung mehrere neue Medikamente eingeführt (Wekerle 2002). Die immunmodulatorischen Präparate, wie INF- β und INF- γ sowie Glatirameracetat führen nur zu einer teilweisen Reduktion von MS-Progression. Neuere Medikamente, wie Mitoxantron, haben nur ein limitiertes Spektrum und sind nur bei der rezidivierenden-remittierenden MS nicht aber bei der primär-chronischen MS wirksam (Neuhaus et al. 2004).

Die genannten Präparate müssen parenteral verabreicht werden. Sie haben eine recht hohe Rate von unerwünschten Effekten (Vollmer et al. 2004). Im Vergleich dazu können Statine oral verabreicht werden, sie sind gut verträglich. Daher könnten sie bevorzugte Präparate für die MS-Therapie werden (Steinman 2002; Youssef et al. 2002; Aktas et al. 2003; Greenwood et al. 2003; Nath et al. 2004).

Neuhaus et al. (2005a) beschreiben die wichtigsten Vorteile der Statine wie folgt:

- Immunmodulatorische Effekte in vitro und in vivo
- Orale Einnahme
- Minimale Risiken
- Etwa 10% preiswerter als Standard-MS-Präparate

Während die Statine viele Jahre als potentielle Immunomodulatoren bekannt waren (Kurakata et al. 1996; Weitz-Schmidt 2002), wurden sie erst in den letzten Jahren in mehreren Publikationen als wirksame Präparate für die MS-Therapie beschrieben (Stanislaus et al. 1999; Neuhaus et al. 2002; Youseff et al. 2002; Aktas et al. 2003; Greenwood et al. 2003; Nath et al. 2004; Peng et al. 2006; Rajanikant et al. 2007; Paul et al. 2008). Die große Anzahl der immunregulatorischen Mechanismen der Statine ist offensichtlich von Bedeutung für die Behandlung der MS (Stüve et al. 2003a). Statine hemmen das Auftreten von T-Zellen im ZNS und ihre Aktivierung. Außerdem unterdrücken sie die Entzündungsmediatoren und senken die Migration der Leukozyten im ZNS. Zusätzlich inhibieren sie die Expression von IFN- γ -induzierte MHC-Klasse-II unterschiedlichen Antigen-präsentierte Zellen (APZ) (Kwak et al. 2000) und senken die Expression von Entzündungsmediatoren durch T-Lymphozyten. Die CD4⁺ Th1-Zellen sezernieren zahlreiche Entzündungszytokine, z. B. die Interleukine: IL-2 und IL-12 sowie IFN- γ und TNF- α ; sie unterdrücken Th2-Zytokine, wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Atorvastatin induziert die Sekretion von Th2-Zytokinen, wie IL-4, IL-5 und IL-10, und unterstützt die Differenzierung von Th0-Zellen in Th2-Zellen (Youseff et al. 2002).

1.3. Statin-sensitive Proteine

Um die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten der Statine für die MS zu verbessern ist es wünschenswert, Statinwirkungen im Tiermodell der EAE auf molekularer und zellulärer Ebene näher zu charakterisieren. Endziel ist es dabei, Hinweise für die Ansprechbarkeit der individuellen MS-Patienten auf die Statintherapie zu erhalten, d.h. möglichst früh Responder von nicht-Respondern zu unterscheiden.

Darüber hinaus sollen bessere Vorhersagen über sinnvolle Kombinationen von Statinen mit etablierten und experimentellen Therapeutika, wie Steroide, Immunsuppressiva, Zytostatika Interferon- β -Präparate, Glatirameracetat und monoklonale Antikörper ermöglicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck die Wirkung von Atorvastatin auf die Expression von Proteinen untersucht, die eine Beziehung zur Pathogenese von MS bzw. EAE aufweisen. Die Identifizierung dieser Statin-sensitiven Proteine erfolgte einerseits im Modell der PLP-Peptid-induzierten chronisch-schübförmigen EAE mittels Microarray-Genexpressionsanalyse. Weitere Kandidatenproteine wurden der Literatur entnommen. Wesentliche Charakteristika und biologische Funktionen der insgesamt 9 untersuchten Statin-sensitiven Proteine und des als Referenzprotein dienende „Haushaltsprotein“ β_2 -Mikroglobulin werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

HSP105 (Hitze-Schock-Protein-105).

Die Hitze-Schock-Proteine, auch Stress Proteine genannt, werden bei normalen physiologischen Zuständen auf niedriger Stufe, und bei zellulärem Stress sehr verstärkt in allen Organen exprimiert. Sie schützen die Zellen vor Stress, beteiligen sich an der Regulation der Apoptose und am intrazellulären Transport von Proteinen, außerdem spielen sie bei normalen Zellfunktionen und bei der neuronalen Protektion des Gehirns eine wichtige Rolle (Morimoto and Santoro 1998; Hatayama et al. 2001; Ishihara et al. 2003). Dadurch hat die Regulation der HSP105 auf molekularer Ebene ein großes Potential für die Therapie von Tumoren, Traumen, Ischämie, Diabetes sowie für die Transplantationschirurgie (Favatier et al. 1997; Oki and Younes 2004). Die HSP105 wird in verschiedenen Geweben als Reaktion auf Stress wie Infekt, Ischämie, Hitzeschock und Tumoren exprimiert (Xue et al. 1998; Morris 2001). Die HSP-Proteine werden in unterschiedliche Familien eingeteilt, sogenannte kleine Proteine (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90) und sogenannte große HSP-Proteine (HSP105/HSP110). Insgesamt unterscheidet man zwei höher-molekular-mass Stress-Proteine, HSP105 α und HSP105 β , die im Zytoplasma bei allen Organismen von Bakterien bis zu Säugetieren nachgewiesen wurden (Hatayama et al. 1986, 1994; Wakatsuki and Hatayama 1998). HSP105-Proteine (HSP105 α und HSP105 β) gehören zur HSP105/HSP110-Familie, die bei Menschen, Mäusen, Hamstern, Pflanzen, Pilzen und Hefen gefunden wurde (Ishihara et al. 1999, 2006; Yamagishi et al. 2006). Das HSP-105 α wird konstant und das HSP-105 β überwiegend beim Hitzeschock von 42°C bei Säugetieren induziert (Ishihara et al. 1999; Yasuda et al. 1999; Saito et al. 2007). Die phosphorylierte und nicht- phosphorylierte Form des HSP105 α wird in etwa gleichen Anteilen von den meisten Geweben exprimiert, dagegen dominiert im Gehirn die phosphorylierte Form (Wakatsuki and Hatayama 1998). Das HSP105 ist ein Marker für verschiedene menschliche Tumoren, was für die Entwicklung einer neuen Tumorentherapie von Interesse sein kann (Hosaka et al. 2006). Experimentelle und klinische Studien haben gezeigt, dass die HSP-Proteine an der Pathogenese von einigen autoimmunen Krankheiten wie autoimmune Arthritis, Diabetes melitus Typ 1, Atherosklerose und MS beteiligt sind (Raska and Weigl 2005). Von Minohara (2003) wurde die Bedeutung des Hitze-Schock-Proteins 105 bei Patienten mit der Multipler Sklerose sowie bei EAE untersucht. Mehrere Befunde, einschließlich Steigerung der Expression von HSP105 bei MS-Läsionen geben Hinweise darauf, dass das HSP105 eine regulatorische Bedeutung für die Entzündung der MS und EAE hat.

COX-1 (Cyclooxygenase-1, Prostaglandin endoperoxide synthase-1, PtgS-1).

Seit 1990 sind die Cyclooxygenasen (COX) als intrazelluläre Enzyme der Prostaglandinsynthese bekannt und haben damit eine entscheidende Bedeutung für Entzündungsreaktionen erlangt. Außerdem beteiligen sie sich an der Blutdruckregulation, Nierenfunktion, Blutgerinnung und entfalten eine erhebliche Wirkung bei kardiovaskulären und allergischen Erkrankungen sowie bei Tumoren. Die Cyclooxygenasen sind stark limitierende Enzyme, die an der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H_2 (PGH_2) beteiligt sind. Die COX-Proteine findet man bei Leukozyten, Endothelzellen, Nierenzellen, Thrombozyten, Gehirn- und Rückenmarkszellen. Zu diesen Proteinen gehören auch die sauren nichtsteroidalen Antirheumatika, wie Acetylsalicylsäure (Aspirin), oder Diclofenac und Ibuprofen. Es gibt mindestens drei Formen der Cyclooxygenasen, die als COX-1, COX-2 und COX-3 bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich darin, in welchen Zellen sie vorkommen und ob sie ständig oder nur bei Bedarf induziert werden. Die Cyclooxygenase-1 ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym, das auch im gesunden Organismus für die ersten Reaktionsschritte bei der Bildung von Prostaglandinen verantwortlich zeichnet. Es wird ständig in verschiedenen Zelllinien produziert (Funk et al. 1991) und im Magen sowie in den Blutgefäßen und Nieren gefunden. Es ist ein „housekeeping“ Protein, welches den ganzen Körper in Gleichgewicht hält. Im Vergleich mit COX-2, das nur bei Entzündungen aktiviert wird, bleibt das COX-1 ständig aktiv und wird konstitutiv von mehreren Geweben exprimiert (Athirakul et al. 2001), wobei seine Aktivität durch äußere Einflüsse relativ wenig moduliert wird. Außerdem hat das COX-1 sehr wichtige physiologische Funktionen für die Zytoprotektion des Magens, die Vasodilatation in den Nieren, die Produktion von Prostanoid sowie für die Plättchenaktivierung (Mohammed et al. 2004; Iezzi et al. 2007). Das COX-2 ist eine induzierbare Form für die Produktion von Prostaglandinen in den entzündeten Geweben und wird von Zytokinen sowie von Wachstumsfaktoren reguliert (Athirakul et al. 2001). Das COX-1 gilt dagegen als konstitutive Form, die für die Produktion von Prostaglandinen im Rahmen von Regulationsmechanismen wie renaler Blutfluss, Thrombozytenaggregation und gastrointestinale Zytoprotektion verantwortlich ist (Vigier 2002). Beide COX-Formen bestehen aus 68% identischer Aminosäuresequenz und besitzen ein Molekulargewicht ca. 70-72 kDa. Die Expression von COX-1 und COX-2 wurde bei unterschiedlichen Erkrankungen nachgewiesen, wie Leberzirrose (Mohammed et al. 2004) sowie akuter und chronischer Arthritis (Iniguez et al. 1998). Die Prostaglandine blockieren beide Enzyme, COX-1 und COX-2 und wirken fiebersenkend (Vigier 2002), entzündungshemmend, und analgetisch (Steinhilber 2003),

wobei das COX-2 mit mehr und das COX-1 mit weniger Schmerzen verbunden ist. Sofern die NSAR (COX-Inhibitoren) die weltberühmten Medikamente für die Behandlung von Schmerzen, Entzündung und Fieber sind (Mitchell and Warner 2006). Bei verschiedenen Karzinomen wird das COX-1 wie auch das COX-2 überexprimiert (Hwang et al. 1998; Sales et al. 2002) und ist damit für die Tumorgenese von Bedeutung (Narko et al. 1997; Chulada et al. 2000; Shibata et al. 2005; Mohammed et al. 2006). Damit sind beide COX-Enzyme an der Pathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms (von Rahden et al. 2005), der Lungentumoren (Bauer et al. 2000), des oralen Adenokarzinoms (Hayes et al. 2006), und des hepatozellulären Karzinoms (Cervello and Montalto 2006) sowie des Kaposi-Sarkoms (Rossiello et al. 2007) beteiligt. Außerdem vermitteln sie Entzündung, Immunmodulation, Apoptose, Blutfluss bei verschiedenen Gehirnerkrankungen.

Die Expression von COX-1 und COX-2 war bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis der Ratte erhöht, was auf ihre Bedeutung in den Entzündungsprozessen assoziierten mit Autoimmunität hinweist (Deininger and Schluesener 1999). Außerdem beeinflussen die Phenidolone die dual-Inhibitoren von Cyclooxygenasen, die klinische Symptome der EAE und wichtige Entzündungsmediatoren in der EAE Pathogenese sind (Moon et al. 2005). Die Behandlung mit Statinen wie das Atorvastatin und das Simvastatin mindert die Expression von COX-2 im Atherosklerose-Modell der Ratte (Hernandez-Presa et al. 2002) und bei Patienten mit Atherosklerose (Cipollone et al. 2003; Martin-Ventura et al. 2005).

ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1).

Das Interzelluläre Adhäsion Molekül-1 (ICAM-1, CD54) ist ein transmembranöses Glykoprotein. Das Molekül besteht aus fünf extrazellulären Domänen, einer transmembranösen und einer kurzen Immunoglobulin-ähnlichen zytoplasmatischen Domäne (Staunton et al. 1988; Stolpe and Saag 1996). Das ICAM-1 kodierende Gen besteht aus sieben Exonen und jede transmembrane Domäne wird durch ein unterschiedliches Exon kodiert (Horley et al. 1989). Beim Menschen befindet sich das ICAM-1-Gen auf dem Chromosom 9 und bei der Maus in der Insulinregion auf Chromosom 19 (Ballantyne et al. 1992).

Das ICAM-1 besteht aus 505 Aminosäuren mit einem relativen Molekulargewicht von 80-100 kDa in Abhängigkeit von der Glykolysierungsebene, vom Zelltyp und von seiner Umgebung (Staunton et al. 1988; Newman et al. 1990). Das ICAM-1 wird bei nicht-hämatopoetischen Zellen (vaskulären Endothellzellen, Epithelzellen des Thymus, dendritischen Zellen, Fibroblasten) sowie bei hämatopoetischen Zellen (Lymphozyten,

Monozyten und Makrophagen) und bei dendritischen Zellen von Tonsillen, Lymphknoten und Peyer-Plaques exprimiert (Dustin et al. 1986; Springer 1990; van de Stolpe and van der Saag 1996).

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Leukozyten aus Blutgefäßen (Walchek et al. 1996). Außerdem beteiligt sich das Protein an der Aktivierung von T-Lymphozyten (Boyd et al. 1988; Blank et al. 2005) und steht mit Rezeptoren der Integrinfamilie in Verbindung. Auch reguliert es Zell-Zell-Interaktionen und die Signal-Transduktion (Sligh et al. 1993). Außer konventionellem membrangebundenen ICAM-1 wurde auch ein zirkulierendes ICAM-1 im Serum von gesunden Menschen nachgewiesen. Nach Rothlein et al. (1991) liegt seine Konzentration bei 100-200 ng/ml. Das ICAM-1 ist ein wichtiger Frühmarker in der Diagnostik von verschiedenen Infektionskrankheiten und autoimmunen Erkrankungen (Seth et al. 1991) und an der Pathogenese der MS beteiligt (Bullard et al. 2007). Eine Erhöhung des Serumgehalts des löslichen ICAM-1 wurde bei Patienten mit Multipler Sklerose (Hartung et al. 1993; Rieckmann et al. 1994), rheumatoider Vaskulitis (Voskuyl et al. 1995), bakterieller Meningitis (Hartung et al. 1993), Apoplex (Frijns and Kappelle 2002), Asthma bronchiale und Graves' Disease (Wenisch et al. 1994) sowie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt beobachtet. In mehreren Studien wurde eine Steigerung der Expression von ICAM-1 in Epithelzellen, Gliazellen, und Endothelzellen bei Humanexperimenten sowie bei Tiermodellen mit verschiedenen Infektions- und Immunkrankheiten des ZNS sowie mit Multipler Sklerose registriert (Sobel et al. 1990; Cannella et al. 1991; McGeer et al. 1993; Greenwood et al. 1995). Weite Nachweise der Hyperexpression von konventionellem membrangebundenem ICAM-1 fanden sich im Rückenmark der Ratte bei chronischen rezidivierenden EAE (Ledeboer et al. 2003), bei humanem Diabetes mellitus Typ 1 (Campbell et al. 1989; Hänninen et al. 1992) sowie bei Patienten mit Atherosklerose (Ross 1993). Mandel et al. (2004) haben die Expression von Genen bei Multipler Sklerose und bei Lupus Erythematosus verglichen. Bei der MS wurden 1031 Gene in Verbindung mit Höherregulation von ICAM-1 identifiziert. Hofmann et al. (2002) haben auch Steigerung der Expression von ICAM-1, VCAM-1, MCP bei EAE der Ratte nachgewiesen. Außer ihrer Bedeutung als wichtige Frühmarker autoimmuner Erkrankungen, können die Adhäsionsmoleküle als neue Therapiemöglichkeit für die Behandlung autoimmuner Erkrankungen benutzt werden (Sligh et al. 1993; Dedrick et al. 2003), was durch Blockade von Adhäsionsmolekülen und Inhibierung der Adhäsion von Leukozyten zu erreichen ist (Dedrick et al. 2003).

In der Literatur wurde die Wirkung der Statine auch auf die Expression von ICAM-1 beschrieben. Statine unterdrücken die Tumorgenese durch Mechanismen die mit der Runterregulation von ICAM-1 korrelieren (Ahn et al. 2007). Das Atorvastatin reduziert die endotheliale Expression von VCAM-1 und ICAM-1 (Nachtigal et al. 2006). Die Behandlung mit Rosuvastatin ist Dosis abhängig und reduziert die Expression von ICAM-1 in den Aortaklappen (Monetti et al. 2007). Ein hoher ICAM-1-Spiegel im Plasma bei Probanden mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen konnte durch die Behandlung mit Atorvastatin gesenkt werden (Blanco-Colio et al. 2007). Simvastatin, Pravastatin und Atorvastatin wirken positiv auf den oxydativen Stress, pro-entzündungs Zytokine inhibieren dabei die Expression von ICAM-1 (Takahashi et al. 2005; Marketou et al. 2006). Statine wie Simvastatin, Atorvastatin und Fluvastatin reduzieren die Expression von Entzündungsmarkern wie ICAM-1 und können daher bei der Behandlung verschiedener Entzündungskrankheiten eine wichtige Rolle spielen (Ascer et al. 2004; Chello et al. 2004; Namazi 2004; Xenos et al. 2005).

CD86 (B 7.2 bindet an CD28 von T-Zellen).

Das CD86 ist auch als B-70, B7-2, LAB72, CD28LG2 oder MGC34413 bekannt. Es ist ein Mitglied der Immunoglobulin-Familie und gehört zum Membran Proteinen Typ 1.

Die B7 Proteine, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sind stimulierende Moleküle, die bei der T-Zellen Aktivierung und der Produktion von Zytokinen wichtig sind (Suvas et al. 2002). Der CD80/CD86-CD28-Signalweg spielt die Hauptrolle bei der humoralen und zellulären Immunität (Fuse et al. 2006). Beide Moleküle exprimieren in aktivierten B-Zellen, Makrophagen, aktivierten Monozyten sowie in aktivierten T-Zellen, jedoch nicht in ruhenden B-Zellen und T-Zellen (Freeman et al. 1993). Das CD86 wird bei ruhenden Monozyten, B- und T-Zellen nach Induktion mit IL-1, IFN- γ und CD40 hochreguliert (Berberich et al. 1994; Larsen et al. 1994; Lenschow et al. 1994).

Das CD86 ist ein 80 kDa Membranprotein Typ 1, das aus 323 Polypeptiden, einer extrazellulären und einer transmembranen Domäne sowie dem zytoplasmischen Ende besteht. Seine extrazelluläre Region enthält eine Ig V-ähnliche und 1 Ig C2-ähnliche Domäne. Die Expression von CD86 ist bei verschiedenen Krankheiten wie allergisches Asthma (Chen et al. 2006; Liang et al. 2006), systematischer Lupus Erythematosus (Bijl et al. 2001), *Aspergillus fumigatus* (Barrios et al. 2005) und Kolitis erhöht (Scarpa et al. 2004). Außerdem wurde das Protein bei humanen Melanomen (Bernsen et al. 2003), Myelomen (Pope et al. 2000), akuter myeloider Leukämie (Maeda and Sobel 1996), Ösophaguskarzinom (Yang and Wang 2004) vermindert exprimiert. Die B7-1 und B7-2 Proteine sind bei der Lymphozyteninfiltration als

Immunantwort gegen Schilddrüsenkarzinom wichtig (Shan et al. 2002). Außerdem ist die Expression von CD86 bei Patienten mit tödlichen Infekten reduziert, was für die Diagnostik von Bedeutung ist (Wolk et al. 2007).

Beide CD80 und CD86 Proteine exprimieren bei bestimmten Krankheiten, was für die Diagnostik und Behandlung sehr hilfreich sein kann. So wird zum Beispiel das CD86 bei autoimmuner Hepatitis (AIH) von den mononuklearen Leberzellen exprimiert (Kurokohchi et al. 2006). Beide Moleküle sind für die Aktivierung von T-Zellen-vermittelten Krankheiten, wie EAE und kollageninduzierte Arthritis von Interesse (Khouri et al. 1995; Webb et al. 1996; Chang et al. 1999). Außerdem wurden sie in den Target-Organen bei immunvermittelnden Erkrankungen einschließlich EAE und experimenteller autoimmuner Thyroiditis gefunden (Karandikar et al. 1998; Peterson et al. 1999). Mehrere Arbeitsgruppen haben die Bedeutung der Autoimmunität von CD80 und CD86 untersucht. Studien über EAE und MS haben die große Bedeutung von B7-1 und B7-2 bei den T-Zellenreaktionen gezeigt (Slavik et al. 1999). Beide B-7-Proteine werden in zirkulierenden B-Zellen und Monozyten während unterschiedlicher MS-Stadien exprimiert (Boylan et al. 1999). Die Arbeitsgruppe von Pelfrey et al. (2005) hat die Hypothese über eine eventuelle Suppression von MS durch Wirkung von Steroidhormonen auf die co-stimulierten Moleküle, wie CD40, CD/CD86 überprüft. Leider sind die bisherigen Ergebnisse nicht bestätigt worden.

TSP-1 (Thrombospondin, extrazelluläres Matrixprotein).

Thrombospondin besteht aus drei durch Disulfidbrücken verbundene Monomeren von Glykoproteinen, jedes mit einem Gewicht von 150,000 kDa. Die Thrombospondine bilden eine Familie von extrazellulären Glykoproteinen, welche für die Zell-Zell oder Zell-Matrix-Kommunikationen verantwortlich sind (Stenina et al. 2007). Sie regulieren den Phänotyp der Zelle während ihrer Genese oder Reparatur. Außerdem haben die Thrombospondine wie viele andere extrazelluläre Proteine, mehrere Domänen, die für verschiedene biologische Funktionen, wie Regulierung von Zellbewegungen, Zellproliferationen, Nervenwachstum, Angiogenese und Apoptose unter physiologischen und pathologischen Bedingungen verantwortlich sind (Zhang and Lawler 2007; Paydas et al. 2008). Die Familie der Thrombospondine besteht aus Thrombospondin 1-5, die in zwei Subfamilien, A und B gegliedert werden (Chatila et al. 2007). Die A-Proteine, wie TSP-1 und TSP-2 sind nach ihrer Struktur Trimere (Lawler and Hynes 1986; Bornstein et al. 1991; LaBell et al. 1992; Laherty et al. 1992). Zur B-Subfamilie des TSP gehören TSP-3, -4 und -5, die nach ihrer Struktur Pentamere sind (Oldberg et al. 1992; Vos et al. 1992; Bornstein et al. 1993; Lawler et al.

1993). Das Thrombospondin-1 ist ein 450 kDa Trimer Glykoprotein, das erstmals von Dr. J. Folkman beschrieben wurde (Folkman 1971). Das TSP-1 wurde aus menschlichen Thrombozyten isoliert (Lawler et al. 1978) und mit Thrombin stimuliert, daher bezeichnet man es als „Thrombin-sensibles Protein“ (Baenziger et al. 1971, 1972). Das TSP-1 kommt in hohen Konzentrationen in den α -Körnchen von Thrombozyten vor und umfasst 25% der gesamten von Thrombozyten sezernierten Proteine, außerdem beteiligt sich das TSP-1 an der Aggregation von Roten Blutkörperchen (Lawler 1986; Isenberg et al. 2008). Das Thrombospondin wirkt zusammen mit mehreren extrazellulären Molekülen wie Heparin (Lawler et al. 1978; Dixit et al. 1984), Kollagen (Mumby et al. 1984), Fibrinogen (Lahav et al. 1984), Plasminogen (Silverstein et al. 1984), Osteonektin (Clezzardin et al. 1988) und Kalzium (Lawler 1986). Das TSP-1 ist ein multifunktionelles extrazelluläres Protein, das die physiologische und pathologische Angiogenese, Zellproliferation und Zellmigration inhibiert sowie die Synaptogenese fördert und sich an der Zellapoptose beteiligt (Adams 2001; Tagnaouti et al. 2007). Außer in Thrombozyten wird das Protein in verschiedenen Zelltypen wie Leukozyten (Jaffe et al. 1985), Fibroblasten (Jaffe et al. 1983), Endothelzellen (Mosher et al. 1982), Makrophagen (Jaffe et al. 1985), glatten Muskelzellen (Raugi et al. 1982), Monozyten (Jaffe et al. 1985) und „granulären“ Pneumozyten (Sage et al. 1983) synthetisiert. Das Thrombospondin findet man in verschiedenen menschlichen Geweben einschließlich Blutgefäßen, Haut, Muskeln, Nieren und Drüsenepithelien (Wight et al. 1985). Die ADAMTS sind eine Familie der Metalloproteinasen, die extrazelluläre Matrixproteine stimuliert und aus Disintegrin, Metalloproteinase sowie aus einem Thrombospondin-1 Fragment besteht. Aus der Literatur ist bekannt, dass die ADAMTS in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen (Goertsches et al. 2005; Haddock et al. 2006). Die Statine, wie das Fluvastatin und das Atorvastatin inhibieren die Expression von TSP-1 sowie die anderen Inhibitoren der Angiogenese und können daher für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sehr nützlich sein (Dulak et al. 2005; McGillicuddy et al. 2006).

PTX-3 (Pentraxin-3, Pentaxin-3, Akute-Phase-Protein).

Das Pentraxin-3 (PTX-3) gehört zur Pentraxin-Familie, den sogenannten akuten Phasen Proteinen, die als Entzündungsmediatoren wichtig sind (Boehme et al. 2007). Sie haben eine zyklische pentamere Struktur mit C-terminalen Domänen, die während der Entzündung produziert werden. Das PTX-3 hat eine ähnliche klassische Pentraxinen C-terminale Domäne. Diese besteht aus 203 Aminosäuren, die aber eine unkontrollierte N-terminale Domäne, mit insgesamt 178 Aminosäuren enthält (Breviario et al. 1992; Lee et al. 1993; Botazzi et al.

1997). Die Pentraxine spielen eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion gegen fremde Mikroben und bei der Regulation von Zellresten (Pepys and Baltz 1983; Kolb-Bachofen 1991; Rolph et al. 2002).

Das PTX-3 ist das erste entdeckte und bislang wichtigste lange Pentraxin (Kunes 2005). Das menschliche Pentraxin-3 Gen befindet sich in dem Chromosom 3 (3q25). Es spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität, der weiblichen Fruchtbarkeit und Autoimmunität (Botazzi et al. 2006; Garlanda et al. 2006; Mantovani et al. 2006). Das PTX-3 wird von verschiedenen Zelltypen produziert und sezerniert, besonders stark von Endothelzellen und mononukleären Phagozyten (Maseri et al. 1996; Talwar et al. 2000; Kimura et al. 2001) sowie von Dendritenzellen und Makrophagen (Bottazzi et al. 2006). Fundorte des PTX-3 sind stimulierte Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten (Alles et al. 1994; He et al. 2007), Dendritenzellen (Doni et al. 2003), Myoblasten (Introna et al. 1996), Gliazellen (Polentarutti et al. 2000), Kaposi-Sarkom Zellen (Klouché et al. 2002), Adipozyten (Abderrahim-Ferkoune et al. 2003), Zellen des Cumulus oophorus von Menschen und Mäusen (Salustri et al. 2004), glomeruläre Mesanglizellen und Endothelzellen (Bussolati et al. 2003), Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis (Luchetti et al. 2000), und dopaminerge Neurone (Cazorla et al. 2000; Burbach et al. 2003). Das PTX-3 ist ein moderner Entzündungsmediator (Han et al. 2005), der als Reaktion auf primäre Entzündungssignale wie Lipopolysaccharide, IL-1 β und Tumor Nekrose Faktor sowie bei Makrophagen, Fibroblasten und Epithelialzellen induziert wird (Introna et al. 1996; Botazzi et al. 1997; Goodman et al. 2000; Garlanda et al. 2005). Der Plasma Spiegel von PTX-3 ist normalerweise sehr niedrig (≤ 2 ng/ml), steigt aber bei unterschiedlichen pathologischen Prozessen (Müller et al. 2001; Presta et al. 2007). Damit ist er ein sehr sensibler Marker für die Frühdiagnostik und Prognose von Erkrankungen (Peri et al. 2000; Latini et al. 2004; Okutani 2006). Das Pentraxin-3 wird massiv im Herzen (Introna et al. 1996) von normalen und hypertrophierenden humanen Kardiomyozyten exprimiert (Peri et al. 2000). Es scheint ein früher Indikator für akute Myokardinfarkte zu sein (Peri et al. 2000; Inoue et al. 2007). Bevelacqua et al. (2006) berichten über die Erhöhung des Pentraxin-3 Spiegels bei einer an Psoriasis Erkrankten. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der PTX-3 Spiegel bei Patienten mit Angina pectoris (Inoue et al. 2007), septischem Schock (Müller et al. 2001), aktiver Vaskulitis (Fazzini et al. 2001), Atherosklerose (Rolph et al. 2002) sowie bei Haemodialyse-Patienten (Boehme et al. 2007) ansteigt.

Agnello et al. (2000) haben eine Steigerung der Expression von PTX-3 im Rückenmark von Lewis Ratten bei der EAE beobachtet. Zusätzlich war das PTX-3 an der Aktivierung der Komplement Kaskade beteiligt (Bottazzi et al. 1997).

Neben ihren Lipid senkenden Effekten wirken die Statine auf die Expression von mehreren Genen. Dabei wurde die Expression von PTX-3 in menschlichen vaskulären Geweben unterdrückt (Morikawa et al. 2004).

SOCS-3 (Suppressor der Zytokin-Signaltransduktion-3).

Die Suppressoren der Zytokine-Signale (SOCS) gehören zu einer Familie der intrazellulären Proteine, die aus acht Mitgliedern – SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3, SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6, SOCS-7 und das Zytokin-induzierte SRC-homolog2 (SH2) CIS Protein bestehen. Diese wurden vor einigen Jahren als negative Regulatoren des Jak/STAT-Signalwegs entdeckt. Alle SOCS-Gene besitzen eine zentrale SH2-Domäne und eine C-terminale Domäne mit 40-Aminosäuren (Masuhara et al. 1997; Alexandr and Hilton 2004). Die Expression der SOCS-Proteine wird durch zahlreiche Zytokine (Emanuelli et al. 2001), Wachstumsfaktoren (Spangenburg 2005) und Hormone (Emanuelli et al. 2000; Stepan et al. 2005) induziert. Dadurch wird die Expression von SOCS-1 und SOCS-3 durch Entzündungs- und Anti-Entzündungs-Zytokine ausgelöst, einschließlich des Tumor Nekrose Faktors (TNF- α) (Fasshauer et al. 2004), des Erythropoetin und Leukemie inhibitorischen Faktors (LIF), der Wachstumshormone und Prolaktin (Campbell et al. 2001), sowie IL-3, IL-6, IL-10 (Adams et al. 1998; Duval et al. 2000; Yasukawa et al. 2000). Die SOCS-Proteine sind ein effektiver Block im JAK-STAT-Signalweg bei der Pathogenese unterschiedlicher Entzündungskrankheiten (Seki et al. 2003). Das SOCS-3 oder (CIS3/JAB2) ist ein SH2-enthaltendes, ca. 30 kDa Protein, das die Signaltransduktion von Zytokinen unterdrückt und die Kinaseaktivität hemmt. Die Expression von SOCS-3 wurde in verschiedenen Geweben wie Thymus, Leber, Lunge, Milz (Starr et al. 1997), Herz (Takahashi et al. 2005), Nieren, Ovar, Nebennieren (Tam et al. 2001) und Hypothalamus (Auernhammer et al. 1998) bei erwachsenen und fetalen Mäusen nachgewiesen. Das Protein wird für die Entwicklung von Plazenta, Leber, Netzhaut und Herz benötigt (Marine et al. 1999; Roberts et al. 2001; Takahashi et al. 2005; Ozawa et al. 2007). Die Expression von SOCS-3 ist während der embryonalen Entwicklung der Erythrozyten-Stammzellenlinie in der fetalen Leber notwendig (Marine et al. 1999). Außerdem spielt das SOCS-3-Protein als Schlüsselprotein bei der Differenzierung von Myoblasten eine bedeutsame Rolle (Spangenburg 2005). Die Expression von SOCS-3 induziert die Astrogenese und fördert die Aufrechterhaltung der neuronalen Stammzellen (Cao et al. 2006). Das SOCS-3 wird bei Patienten und in Tierexperimenten bei Brandtrauma (Ogle et al. 2000), Stress-induzierter Insulinresistenz (Rui et al. 2002), Arthritis, Crohn-Krankheit (Suzuki et al. 2001; Ivashkiv and Tassiulas 2003), Kolitis (Miyanaka et al.

2007), Interferon- γ -resistente myelogene Leukemie (Sakai et al. 2002) und myelodysplastischem Syndrom überexprimiert. Das SOCS-3 ist ein wichtiger Regulator in der Zytokin-vermittelten Zellzyklusinhibition und könnte daher als Tumorsuppressor wirksam sein (Weber et al. 2005).

Die SOCS-1 und SOCS-3 Proteine können eine entscheidende Rolle in der EAE spielen (Stark und Cross 2006). Die Modulation der Expression von SOCS-3 kann die endogene Reaktion beim ZNS-Verletzungen unterstützen (Emery et al. 2006). Statine wie Lovastatin und Fluvastatin induzieren die Expression von SOCS-3 bei Makrophagen. Dieser Effekt ist spezifisch und kann von Mevalonaten blockiert werden (Huang et al. 2003).

Ras (Kleine GTPase).

Die Ras-Proteine gehören zur Superfamilie der kleinen GTPasen mit einem Molekulargewicht von ca. 20-25 kDa. Sie erfüllen viele Aufgaben in der Zelle wie Wachstum und Differenzierung, Regulation beim Aufbau des Zytoskeletts und bei der Zellmigration sowie bei der Regulation von Exo- und Endozytose und Vesikeltransport (Bourne et al. 1990).

Die Proteine der Ras-Familie lassen sich strukturell und funktionell in Unterfamilien einteilen: Ras, Rab, Arf, Ran, Ral und Rho (Takai et al. 2001). Für den Menschen wurden drei unterschiedliche Ras-Proteine beschrieben: H-Ras, K-Ras und N-Ras, die eine wichtige Rolle in unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden spielen. Die Ras-Proteine besitzen eine GTP-bindende Region und eine GTPase Aktivität, sowie eine GDP/GTP Austauschfunktion (Barbacid et al. 1987). Der Name „Ras“ leitet sich von *rat sarcoma* ab, weil das Ras-Gen zuerst bei den Harvey-(H-Ras) und Kirsten-(K-Ras)-Stämmen des *rat sarcoma* Virus entdeckt wurde (Barbacid 1987). Die Bezeichnung N-Ras kommt von Neuroblastom, bei welchem das Gen zuerst identifiziert wurde. Alle Ras-Proteine werden ubiquitär exprimiert und sind hochkonserviert. Alle Ras-Proteine kommen in der Zelle in zwei unterschiedlichen Aktivitätszuständen vor, dem aktiven GTP-gebundenen (99,75%) und dem inaktiven GDP-gebundenen (Scheele et al. 1995; Li and Zhang 2004). Das Ras-Protein ist der Schalter des Zellwachstums, der Aktinreorganisation und Zellmotilität, die bei einem Defekt zur Krebsentstehung beitragen und die Metastasierung von Tumorzellen verursachen können (Fritz and Kaina 2006). Die wichtige Rolle von Ras-Proteinen in der Karziogenese ist gut bekannt (Konstantinopoulos et al. 2007).

Die Inhibition von kleinen GTP-bindenden Proteinen wie Ras, Rac und Rho sind für die biologische Wirkung von Statinen sehr wichtig (Fritz 2005). Denoyelle et al. (2001) haben den Einfluss der Inhibition des Ras und RhoA induzierten Cerivastatin auf die

Zellproliferation von zwei Karzinomzelllinien untersucht. Die Studie hat gezeigt, dass das Cerivastatin die Zellproliferation und die Invasivität von Karzinomzellen inhibiert, was hauptsächlich durch Rho erfolgt.

Die Ras und Rho Proteine wurden als wichtige Targets bei direkten antiproliferativen Wirkungen von Statinen bei verschiedenen Zelltypen beschrieben (Negre-Aminou et al. 1997). Jedoch werden in der Literatur unterschiedliche Meinungen über die Statinwirkungen auf kleine GTPasen geäußert. Bei der Inhibition von Brusttumoren können sie effektiv sein (Kobashigawa et al. 1995). Das Mevastatin inhibiert die Prenylation von GTP-bindenden Proteinen einschließlich Ras (Luckman et al. 1998; Fenton et al. 2002).

Die Statine inhibieren die 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reduktase (HMG-CoA), das Enzym, welches die Konvertierung von HMG-CoA ins L-Mevalonate katalysiert (Istvan and Deisenhofer 2001). Die Mevalonate beteiligen sich nicht nur bei der Cholesterolsynthese sondern können auch sehr wichtig sein für die Isoprenylation von GTP-bindenden Proteinen wie Ras, Rap1, RhoA und RhoB, Rac (Ghittoni et al. 2006; Trebicka et al. 2007). Die Statine blockieren den Mevalonaten-Signalweg und inhibieren dadurch die pro-entzündlichen T-Helfer-Zellen (Th1) während der EAE. Auf diese Weise können sie bei der Behandlung von MS und anderen Th1-vermittelten Erkrankungen sehr wirksam sein (Brinkkoetter et al. 2006; Dunn et al. 2006). Das Atorvastatin unterdrückt die Geranylgeranylation von Rho und inhibiert dadurch die Metastasierung von Melanomzellen (Collisson et al. 2003). Holstein et al. (2002) haben via Western blot die Nachwirkungen von Mevalonatendepletion auf die Expression kleiner GTPasen wie Ras, Rap1a, RhoA und RhoB untersucht. Die K562 Zellen wurden mit dem 10 µM Lovastatin inkubiert und bereits nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden war der Spiegel von Ras signifikant erhöht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Depletion von Mevalonaten die Überexpression von Ras, Rap1a, RhoA und RhoB induziert. Blanco-Colio et al. (2002) haben auch die Reduzierung der Prenylation von RhoA und Mevalonaten bei der Behandlung mit Statinen entdeckt. Durch die Inhibition der Isoprenylation von Ras-Proteine hemmen die Statine das Wachstum von Mammakarzinomen (Campbell et al. 2006).

Die Daten von Bassa et al. (1999) zeigen, dass das Lovastatin durch die Inhibition von Farnesylphosphaten und Mevaloniksäure die Aktivierung von Ras unterdrückt, sodass es zur Inhibition von MAP-Kinasekaskade kommt. Außerdem inhibiert die Inkubation von Mesangliumzellen mit Lovastatin die Zellproliferation und mindert den Spiegel von membranverbundenem Ras (Bassa et al. 1999).

P-STAT-6 (Phospho-Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription).

Die STAT-Proteine wurden wegen ihrer Wirkung bei der Transduktion von Signalen im Zytoplasma und ihrer aktivierenden Nukleustranskription, STAT genannt. Sie gehören zu einer wichtigen Familie der Signalüberträger und Aktivatoren. Zurzeit sind sieben Mitglieder der STAT-Familie (STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b, STAT-6) bekannt (Wurster et al. 2000; Ihle 2001). Sie spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen in der Embryonalentwicklung und Organogenese, bei der Regulation von Zellwachstum und Apoptose, sowie bei der angeborenen und erworbenen Immunität (Levy and Darnell 2002). Die STAT-Proteine besitzen eine typische Struktur mit einer zentralen DANN-Domäne, und einer SH2-Domäne (Pesu et al. 2000). Sie wurden bei Säugetieren sowie bei Dictyostelium, Caenorhabditis, Anopheles, Drosophila und Xenopsis beschrieben (Kisseleva et al. 2002). Diese Proteine sind an der phosphorylierten Rezeptoruntereinheit gebunden, werden dabei phosphoryliert und dimerisiert, danach wandern sie in den Zellkern, wo sie die Genexpression regulieren. Jedes Mitglied der STAT-Familie wird von einer spezifischen Rezeptorkombination aktiviert. Das STAT-6 wird z. B. von IL-4 aktiviert (Wurster et al. 2000). Außerdem soll das STAT-6 an der antiapoptotischen Wirkung von IL-4 beteiligt sein (Wurster et al. 2002). Das IL-4 Cytokin ist an der Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten beteiligt (Paul 1997). Die Rezeptor-Bindung löst eine Kaskade von Tyrosin-Phosphorylierungs-Reaktionen aus, die von Kinasen der Janusfamilie (Jak) katalysiert werden (Levy and Darnell 2002). Durch die Phosphorylierung von STAT-Molekülen wird die Bildung von Homo- oder Hetero-Dimeren ermöglicht, die in den Zellkern einwandern und als Transkriptionsfaktoren an der DNA anbinden (Liu et al. 1998; Wurster et al. 2000; Ihle 2001). Die Aktivierung des Signalwegs von STAT-6 spielt eine bedeutende Rolle in der Differenzierung und Maturation von Dendritenzellen (Jackson et al. 2004). Wie die anderen STAT-Proteine wird das STAT-6 mit der JAK-Kinase phosphoryliert. Der JAK-STAT-Signalwege (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) gehört zu den wichtigsten Mechanismen der Signalübertragung von Zytokin-Rezeptoren zum Zellkern (Liu et al. 1998) und beteiligt sich außerdem an der Regulation von Zellentwicklungen, Wachstumskontrollen und Homöostase. Auf diesem Signalweg können eukaryote Zellen Informationen von extrazellulären Signalpeptiden der Zellmembran intrazellulär weiterzuleiten. Die Dysregulation des JAK/STAT-Signalwegs hat pathologische Implikationen (Bowman et al. 2000; Ward et al. 2000). Zusätzlich wurde diesem Signalweg bei einzelnen Erkrankungen wie obstruktive Neuropathie und Gelenkrheumatismus eine große Bedeutung zugemessen (Yukawa et al. 2005; Walker et al. 2006).

In der Literatur wurden einzelne Daten über die Bedeutung von STAT-6 und STAT-4 bei der MS mitgeteilt. Youssef et al. (2002) haben das Atorvastatin bei der chronischen und rezidivierenden EAE untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass das Atorvastatin die Phosphorylierung von STAT-6 und die Sekretion von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-5 und IL-10) sowie des Transforming growth factor (TGF- β) induziert. Zusätzlich unterdrückt das Atorvastatin die Phosphorylation von STAT-4 und fördert die Phosphorylation von STAT-6. Dadurch können die Statine bei der Behandlung der MS und anderen Th1-vermittelten Krankheiten hilfreich sein. Bei der EAE induziert das Lovastatin, die Phosphorylation von STAT-6 und unterdrückt sie von STAT-4. Daher kann das Lovastatin als ein denkbare Medikament für die Behandlung der Multiplen Sklerose und anderen Entzündungserkrankungen sein (Nath et al. 2004).

1.4. Statine und Neurogenese / neurale Vorläuferzellen

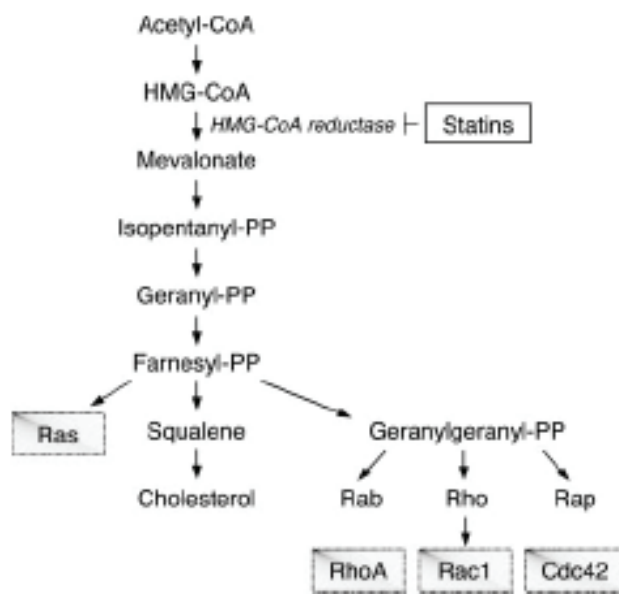


Abb. 2 Cholesterolsynthese-Signalweg und die Wirkungen der Statine. Die Inhibition von HMG-CoA-Reduktase mittels Statine blockiert die Synthese der Zwischenprodukte, Isoprenoide, wie Farnesyl-PP und Geranylgeranyl-PP, die zur Inhibition von kleinen GTPasen, wie Ras, Rho, Rab und Rap führt. Unter der Rho-GTPasen sind die RhoA, Rac1 und Cdc42 CoA Koenzyme A; PP. Pyrophosphate abgebildet. Von Rikitake and Liao (2005).

Der Mevalonate-Signalweg ist ein wichtiger zellulärer methabolischer Weg, der bei allen Eukaryonten und Bakterien anwesend ist und für das Zellwachstum und Zellüberleben von großer Bedeutung ist (Goldstein and Brown 1990). Die Statine inhibieren die HMG-CoA-Reduktase, die sich an der Konversion von HMG-CoA zu Mevalonaten beteiligen und dadurch die Statine der Cholesterolsynthese blockieren. Außer der Inhibition der

Cholesterolsynthese, blockieren die Statine auch die Synthese von Isoprenoiden (Rikitake and Liao 2005). Diese sind sehr wichtige Protein-Bindungen für die postranslatorische Modifikation unterschiedlicher Proteine, die zu Rho, Ras, Rap und Rab GTPasen gehören (Aelst and D'Souza-Schorey 1997). Mehrere Studien haben bestätigt, dass die Statine zusätzlich zu ihrer Cholesterol senkenden Wirkung, über andere vorteilhafte Effekte verfügen, die meist durch Unterdrückung der Synthese von Isoprenoiden entstehen (Bellosta et al. 2000; Toledano and Partridge 2000; Stamatakis et al. 2002; Banes-Berceli et al. 2006).

Mit der gleichen Funktion können die Statine für die EAE- und MS-Behandlung vorteilhaft sein. Wie bereits erwähnt wurde, ist die 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA-Reduktase ein entscheidendes Enzym im Mevalonaten-Signalweg, der die Biosynthese von Cholesterol und Isoprenoiden reguliert. Das farmesylierte Ras und die geranylierten RhoA-Proteine sind die Targets für Atorvastatin in der Immunmodulation in vivo. Die Blockade von HMG-CoA-Reduktase durch Statine inhibiert die destruktive pro-entzündliche Aktivität der T-Helfer-Zellen während der EAE, was für die Behandlung der MS und andere TH1-vermittelte autoimmune Erkrankungen sehr vorteilhaft sein kann (Dunn et al. 2006).

Lange Zeit war die Rho-GTPasen-Familie nur als Schlüssel-Regulator des Aktin Zytoskeletts von Eukaryonten bis zum Homo sapiens bekannt (Aels and D'Souza-Schorey 1997). Jedoch wurde in den letzten Jahren festgestellt, dass die Rho-GTPasen auch für die Entwicklung und Differenzierung von Neuronen, für Neuronenvermehrung, Zellwachstum, neuronalen Aufbau, neuronale Migration, Bildung der Neurit/Axon-Formation, Erhaltung der Dendrit/Rückenmark-Formation und der Synaptogenese von Bedeutung sind (Negishi and Katoh 2002; Govek et al. 2005). Die kleinen GTPasen sind die entscheidenden Targets der Statine in verschiedenen Systemen, wo sie eine führende Position in der Neurogenese und besonders in der Formatierung neuronaler Netzwerke einnehmen (Negishi and Katoh 2002). Die Rho-GTPasen sind an der Regulation der morphologischen Strukturierung der Neurone, insbesondere beim Aufbau ihrer Polarität, dem Axonalwachstum und der Bildung von Synapsen beteiligt, außerdem stimulieren sie der Neurogenese sowie die neuronale Regeneration (Ménager and Kaibuchi 2003). Darüber hinaus regulieren sie mehrere Signalwege, die sich an der Neuronenentwicklung beteiligen und Schlüssel-Regulatoren für das Überleben von Neuronen sind (Govek et al. 2005).

Daher ist es bedeutungsvoll die Wirkung der Statine auf die kleinen Rho-GTPasen sowie auf die Neurogenese zu untersuchen. Um den Einfluss der Statine in der Neurogenese zu testen, haben Pooler et al. (2006) Zellkulturen von Hippokampusneuronen mit Pravastatin behandelt. Schon nach 4 bis 48 Stunden Pravastatin-Behandlung waren die Anzahl und Länge der Neuriten erhöht. Dabei wirkte die Co-Inkubation mit Mevalonaten auf die Statine bei der

Neurogenese vernichtend. Auf diese Weise führte die Behandlung mit Pravastatin zur Erhöhung des Neuronenwachstums, aber nur durch die Inhibition der Aktivität von geranylierten Proteinen, wie z.B. RhoA (Pooler et al. 2006).

Govek et al. (2005) haben in einer Studie den Einfluss der Statine auf die Zellmorphologie und die Formierung der Neuriten bei einer neuronalen Zelllinie bestätigt. Untersuchungen von Zheng and Chen (2007) über die Wirkung von Pravastatin auf die Neuroprotektion und die Neurogenese im Gyrus dentatus sowie im Striatum der Ratte nach der Zerebralen Ischämie haben gezeigt, dass Pravastatin die Neurogenese induziert und die Zahl der migrierenden Zellen im Striatum erhöht. Longo et al. (2006) bezeichnen die Statine neben anderen kleinen Molekülen, wie morphogenetische Proteine Wnt, Katenin, Notch, Antidepressante, Steroide und Wachstumsfaktoren als fördernde Moleküle der Neurogenese.

Chen et al. (2003) haben mit ihren Befunden bestätigt, dass Statine die Neurogenese, Angiogenese und Synaptogenese induzieren. Demnach induziert das Atorvastatin die Angiogenese und endogene Zellproliferation sowie die Neurogenese bei der Ratte bereits einen Tag nach dem Schlaganfall. Auch die Daten von Lu et al. (2007) bestätigen, dass die Behandlung mit Statinen die Neurogenese im Gyrus dentatus erhöht und der neuronale Verlust im Hippokampus nach Gehirninsult reduziert wird. Somit wirkt die Atorvastatin-Behandlung auf die endotheliale Dysfunktion unterdrückend, sie fördert die Neuroprotektion und unterstützt die Regeneration des Rückenmarks nach dem Insult (Pannu et al. 2007). Das Lovastatin hat nach dem Insult einen neuroprotektiven Effekt und schützt den Hippokampus der Ratte von der Neurodegeneration (He et al. 2006). Daher kann die Behandlung mit Lovastatin den Ausfall von Neuronen im Hippokampus nach epileptischem Insult unterdrücken (Rangel et al. 2005). Desgleichen hat die kürzere (1 Tag) oder längere (von 2-8 Tage) Simvastatin-Behandlung einer Zellkultur von neugeborenen und adulten Oligodendrozyten der Ratte Einfluss auf die zellulären Prozesse, die Dynamik sowie für das Überleben der Zellen (Miron et al. 2007). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Statine, wie das Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin nicht nur die Biosynthese von Mevalonaten blockieren, sondern auch noch das Wachstum und die Proliferation von normalen Zellen und Krebszellen inhibieren können (Jones et al. 1994; Falke et al. 1998).

Denoyelle et al. (2001) haben die Wirkung von Cerivastatin auf zwei Brustkarzinomzelllinien untersucht. Das Cerivastatin inhibiert die Proliferation von beiden Zelllinien hauptsächlich durch die Inhibition von Rho und weniger durch Ras. Außerdem inhibiert das Cerivastatin den RhoA/ROCK-Signalweg durch Suppression von RhoA-Prenylation, was für die Therapie von aggressiven Formen des Mammakarzinoms vorteilhaft sein kann (Denoyelle et al. 2003). Bei der Inhibition von RhoA-Prenylation induziert das Cerivastatin eine duale Regulation (1)

auf mechanischer Ebene, die Inhibition des RhoA/ROCK-Signalwegs führt zum Verlust von Zugkräften des Aktin Zytoskeletts, das für die Motilität der Zellen benötigt wird. (2) Auf der biochemischen Ebene, (2) bei welcher der RhoA/FAK/AKT-Signalweg für die Inhibition von transkriptionalen Faktoren zuständig ist, werden die spontan durch MDA-MB-231 aggressiven Krebszellen aktiviert. Schließlich wird angenommen, dass diese Inhibition des RhoA-Zell Signalwegs eine vorteilhafte Methode für die Therapie von aggressiven Formen des Mammakarzinoms sein könnte. Auch Andela et al. (2003) haben den Mevalonate-Signalweg als Target für die Therapie Tumoren bezeichnet. Bei den alveolären Karzinomzellen (Linie 1) wurde der Mevalonate-Signalweg inhibiert und dadurch die Zellproliferation vermindert.

Die Wirkung von Pravastatin wurde auf die Neuroprotektion und auf die Neurogenese nach der zerebrale Ischämie im Gyrus dentatus der Ratte untersucht. Dieses Medikament soll die Regeneration beim ischämischen Stroke fördern (Zheng and Chen 2007). Desgleichen bestätigen die Daten von Lu et al. (2007), dass die Behandlung mit Atorvastatin und Simvastatin die Neurogenese im Gyrus dentatus verbessert, wodurch der neuronale Verlust nach Gehirntrauma vermindert und die Neurogenese im Gyrus dentatus begünstigt wird.

Die Stammzellentransplantation wurde als neue Methode für die Behandlung von Erkrankungen des ZNS empfohlen. Bei demyelinisierenden Krankheiten, z.B. der MS können verschiedene Typen von Stammzellen, wie Vorläuferzellen und Schwann-Zellen nützlich sein (Ben-Hur 2008). Lee et al. (2007) haben die Wirkung von Simvastatin auf die embryonale Stammzelllinie ESZ der Maus untersucht. Die Daten bestätigen, dass die Statine unabhängig von ihren Cholesterol senkenden Effekten die Translokation der Zytosol-Membranen von Rho Proteinen selektiv blockieren, den Spiegel von Rho-Kinase senken, Änderungen in der Zellmorphologie induzieren und die Zellproliferation sowie die Zellregeneration durch die Inhibition von RhoA Geranylgeranylation und die Modulation von Rho/ROCK-Signalweg vermindern können. Karussis et al. (2006) bezeichnen die Zellen des Knochenmarks und die neuronalen Stammzellen als ein Potenzial für die Behandlung der MS. Die Stammzellen des Knochenmarks können in die Entzündungsregionen des ZNS migrieren und sich zu Neuronen und Gliazellen differenzieren, was für die Behandlung der MS und für andere neurodegenerative Krankheiten vorteilhaft ist (Karussis and Kassis 2007). Uccelli et al. (2007) berichten über die Verwendung neuraler Stammzellen (NSZ) und mesenchymaler Stammzellen für die Behandlung der MS sowie für andere autoimmune Erkrankungen des ZNS. Desgleichen hat die Studie von Magalon et al. (2007) gezeigt, dass der Einsatz von adulten neuralen Stammzellen eine Alternative für die Regeneration von Gehirndefekten darstellt. Zahlreiche Autoren haben die Wirkung der Statine auf die Apoptose untersucht.

Dabei wurde der Effekt von Lovastatin und Pravastatin auf das Wachstum und die Überlebenschance von Gehirneuroblasten der Ratte analysiert (Garcia-Roman et al. 2001). Bei der Ratte wurde festgestellt, dass das Lovastatin und nicht das Pravastatin das Zellwachstum durch die Erzeugung der Apoptose immortalisierter Gehirneuroblasten unterdrückt. Diese Effekte waren mit Minderung der Prenylation von RhoA und Ras Proteinen verbunden (Garcia-Roman et al. 2001). Dieselbe Arbeitsgruppe hat auch festgestellt, dass Lovastatin-Effekte auf die Neuroblasten des Gehirns durch die Inhibition des wichtigsten PI3-K/PKB-Signalwegs entstehen, die das Zellwachstum und das Zellüberleben regulieren (Cerezo-Guisado et al. 2005). Die Statine inhibieren nicht nur die Biosynthese von Mevalonaten, sondern blockieren auch das Wachstum und die Zellproliferation von normalen Zellen sowie Tumorzellen und induzieren den Zelltod bei Apoptose (Raiteri et al. 1997; Guijaro et al. 1998).

Allerdings fördern niedrige Atorvastatin-Dosen die funktionelle Wiederherstellung nach einem Apoplex, wobei sie die Angiogenese, Neurogenese und Synaptogenese induzieren (Chen et al. 2003). Dagegen inhibieren höhere Atorvastatin-Dosen die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellmigration (Weis et al. 2002). Desgleichen berichten Bösel and Endres (2006), dass nur höhere Statindosen die neuronale Apoptose induzieren können.

Ein wichtiger, in jüngster Zeit zunehmend in den Fokus der MS-Forschung gerückter Aspekt ist die degenerative Komponente der MS-Pathogenese, die bei einigen Verlaufsformen eine dominante Rolle zu spielen scheint. Daraus leitet sich ab, dass therapeutische Interventionen mit Statinen möglicherweise auch eine neuroprotektive bzw. neuroregenerative Wirkung entfalten können. Grundlage der Neuroregulation ist das Vorhandensein neuraler Vorläuferzellen, die sich sowohl in Gliazellen, einschließlich Oligodendrozyte als auch in Nervenzellen differenzieren können. Um Hinweise auf die Wirkung von Statinen auf neurale Vorläuferzellen zu erhalten, wurden die Untersuchungen zur Atorvastatinbeeinflussung auf Statin-sensitive Proteine in der vorliegende Arbeit durch eine neurale Vorläuferzelllinie erweitert, und zwar sowohl im Proliferations- als auch im frühen Differenzierungsstadium.

Die Zellen der striatalen Progenitorzelllinie ST14A aus dem primordialen Stratum von Feten der Sprague-Dawley Ratte des 14. Embryonaltages (Charles River, Italy) wurden im Labor von Prof. Dr. E. Cattaneo erstmalig isoliert und beschrieben (Cattaneo et al. 1994; Cattaneo and Conti, 1998). Die Immortalisierung der ST14A-Zelllinie erfolgte durch retrovirale Transfektion mit einer temperatursensitiven Mutante A58/U19 Allele des SV40 Large T Antigen (Frederiksen et al. 1988). Bei 33°C permissiver Temperatur proliferieren diese Zellen normal, exprimieren besonders reichlich Nestin und zeigen Reaktionen auf bFGF

Stimulationen. Außerdem exprimieren sie das MAP2 und Jak2 sowie die spezifischen Wachstumsfaktoren und Wachstumsrezeptoren, den Nerv Growth Factor (NGF) und Trk-Rezeptoren (Cattaneo et al. 1996; Cattaneo and Conti 1998). Bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C hören die Zellen der striatal Vorläuferzelllinien ST14A auf, sich zu teilen und differenzieren sich zu Glia- und Nervenzellen (Renfranz et al. 1991; Almazan and McKay 1992; Cattaneo et al. 1994; Ehrlich et al. 2001; Hoffrogge et al. 2007) sowie haben alle Eigenschaften von neuronalen Stammzellen (Hoffrogge et al. 2007). Außerdem produzieren die Vorläuferzellen unterschiedliche neurotrophische Faktoren, die für die Zellproliferation, das Zellüberleben sowie für die Zelldifferenzierung von spezifischen neuronalen Populationen wichtig sind (Cattaneo and Pelicci 1998). Desgleichen war der Einsatz von ST14A-Zellen bei genetischen Experimenten erfolgreich (Cattaneo et al. 1996; Corti et al. 1996). Daher haben sie eine große Bedeutung für biochemische, molekulare und biologische Studien (Salvietti et al. 1996).

Der Ersatz defektiver Neurone durch neuronale Vorläuferzellen lässt einen neuen Ansatz für die Behandlung verschiedenartiger neurologischer Erkrankungen erkennen, wie Alzheimerkrankheit, Morbus Parkinson, Chorea Huntington, MS sowie Schlaganfall und Trauma (Kondziolka et al. 2000; Mitome et al. 2001; Kim et al. 2002; Dezawa 2008; Hara et al. 2008; Modo et al. 2008; Newman and Bakay 2008; Van Wijmeersch et al. 2008).

1.5. Fragestellung

In der vorliegenden Studie soll die Wirkung von Statine auf die Expression von Proteinen untersucht werden, die potentielle Targets und Verlaufsparameter der Statinbehandlung in der Experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) darstellen. Dazu wurde das in der Klinik am häufigsten verwendete Prototypstatin Atorvastatin ausgewählt und in der PLP-Peptid-induzierten EAE der Maus eingesetzt, die durch ihren chronisch-schubformigen Verlauf der häufigsten Verlaufsform der multiplen Sklerose (MS) am nächsten kommt. Aufgabe ist es:

1. Mittels der quantitativen Western-Blot-Methode die Expression zuvor erfolgter Genexpressionsanalysen bzw. aus Literaturangaben entnommener Statin-sensitive Proteine in den hauptsächlich von der Krankheit betroffenen Organen (Lymphknoten und Rückenmark) zu bestimmen. Dabei sollten Unterschiede zwischen
 - (1) behandelten und
 - (2) unbehandelten EAE-Mäusen sowie
 - (3) statinbehandelten gesunden Mäusen erfasst werden, die zu den Zeitpunkten Krankheitsbeginn, erster Schub und erste Remission auftreten.

2. Um Hinweise für potentielle neuroregenerative Effekte zu erhalten sollen neurale Vorläuferzellen in die Untersuchungen einbezogen werden. Dazu ist die Wirkung von Atorvastatin auf die Expression der gleichen Statin-sensitiven Kandidatenproteine wie in der EAE in Kurzzeitkulturen einer etablierten neuronalen Vorläuferzelllinie unter
 - (1) Proliferationsbedingungen und
 - (2) frühen Differenzierungsbedingungen zu bestimmen.

Die Untersuchungsergebnisse sollen einen Beitrag zur Etablierung therapeutisch und prognostisch kräftiger Marker für klinische Studien am MS-Patienten sein, die mit Statinen behandelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungen in der EAE

2.1.1. Induktion und klinische Beurteilung der EAE

Männliche SJL Mäuse wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter Standardbedingungen im Zentralen Versuchstierhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock gehalten. Sieben Wochen alte Mäuse wurden subkutan mit 150 µg enzephalitogenem Peptid immunisiert, das die Aminosäuren 139-151 des Myelinproteins PLP (American Peptide Company, Sunnyvale, CA), in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA, Sigma, St. Louis, MO) enthält. Zum Erreichen eines potentiell milden, mit MS vergleichbaren Krankheitsverlaufs, und um einen Einfluss des weiblichen Hormonzyklus auf die Untersuchungsergebnisse auszuschließen, wurden männliche Tiere bevorzugt. Zusätzlich erhielten die Mäuse am 3. Tag nach der Immunisierung (n.i.) 500 ng Pertussis Toxin (Sigma) intraperitoneal zusammen mit dem PLP-Peptid. Der Schweregrad der aufgetretenen Paresen wurde wie folgt eingestuft: 0 normal; 1 schlaffe Schwanzparese; 2 leichte Parese der hinteren Extremitäten; 3 schwere Parese der hinteren Extremitäten; 4 Tetraparese.

2.1.2. Behandlung mit Atorvastatin

Bei der Statin-Behandlung erhielten die Tiere 200 µg Atorvastatin (Sortis, Pfizer, Karlsruhe) (B₁) gelöst in 100 µl PBS (L₈) pro Maus und Tag oral mittels Mikropipette. Die Dosis entspricht 10mg/kg Körpergewicht. Die Kontrolltiere erhielten nur 100 µl PBS (L₈). In Anlehnung an den klinischen Verlauf begann die Behandlung mit Atorvastatin nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome am Tag 10 n.i.. Es wurden folgende experimentelle Tiergruppen gebildet (s. Abb. 3):

A: normale gesunde Kontrolltiere (Tag 0 n.i.),

B, C und D: EAE-Mäuse an den Tagen 10, 20 bzw. 30 n.i.,

E und F: Kontrolltiere, die 10 bzw. 20 Tage Atorvastatin erhielten, aber nicht immunisiert wurden,

G und H: EAE-Mäuse, die ab Tag 10 n.i. 10 bzw. 20 Tage lang Atorvastatin erhielten.

Die behandelten Mäuse wurden an den Tagen 10, 20 und 30 n.i. getötet, entsprechend den Krankheitsphasen (Beginn, Höhepunkt, und Abklingen der Krankheit). Die Kontrollmäuse erhielten nur CFA (Sigma).

Das experimentelle Design ist in seinen Grundprinzipien in der Abb. 3 dargestellt.

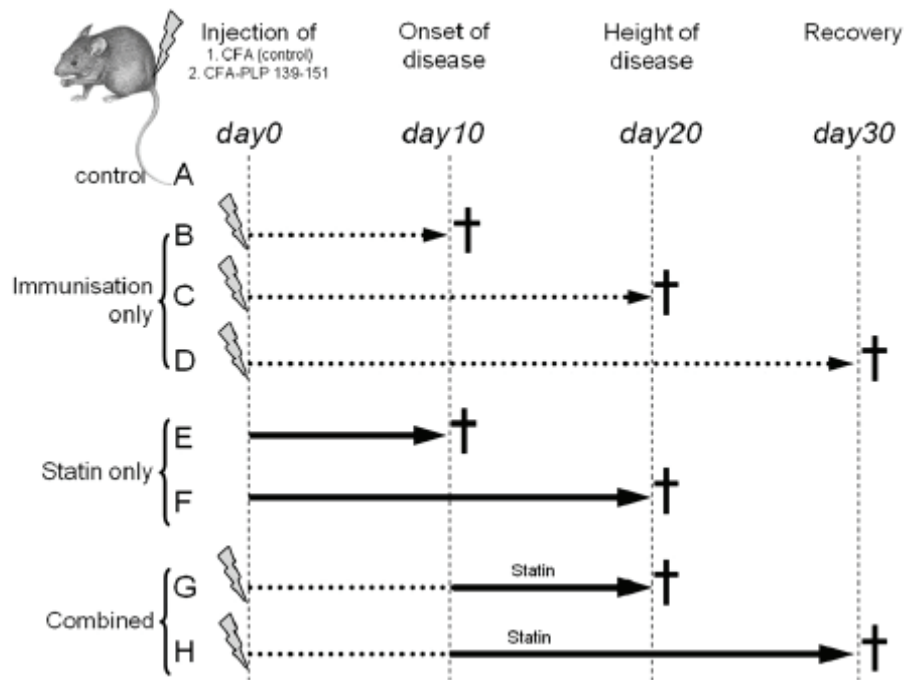


Abb. 3 Experimentelles Design der Studie zur Untersuchung von Gen- und Proteinexpression in Lymphknoten und im Rückenmark von EAE-Tieren mit und ohne Atorvastatin Behandlung. Die Mäuse der Gruppen B-D wurden mit dem PLP-Peptid 139-151 und CFA am Tag 0 immunisiert und am Tag 10 (Gruppe B), am Tag 20 (Gruppe C) oder am Tag 30 (Gruppe D) getötet. Die Mäuse der Gruppen G und H erhielten Atorvastatin von Tag 10 bis Tag 20 bzw. von Tag 10 bis Tag 30. Den Kontrollgruppen E und F wurden CFA-Injektionen appliziert und für 10 bzw. 20 Tage Atorvastatin verabreicht. Die Kontrollmäuse der Gruppe A erhielten auch CFA-Injektionen, jedoch kein Atorvastatin.

Die Experimente wurden entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen von der zuständigen Aufsichtsbehörde des Landwirtschaftsministeriums des Landes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt.

2.1.3. Präparation von Lymphknoten und Rückenmark

Die regionalen Lymphknoten (axilläre, präperitoneale, mesenteriale, inguinale und popliteale) der Tiergruppen A-H wurden jeder Maus aseptisch entnommen und für die weitere Verarbeitung (RNA- und Proteinextraktion) genutzt. Desgleichen erfolgte die Entnahme des Rückenmarks von jeder Maus der gleichen Tiergruppen. Für die RNA- und Proteinextraktion sowie für die in dieser Arbeit nicht dargestellten immunhistochemischen Analysen wurde das Rückenmark in zervikale, thorakale und lumbo-sakrale Abschnitte aufgeteilt.

2.1.4. RNA-Isolierung aus Lymphknoten und Rückenmark (diese Untersuchungen wurden von Dr. Dirk Koczan, Institut für Immunologie der Universität Rostock durchgeführt)

Zur Analyse der Genexpression wurden sämtliche individuelle mRNAs von Mäusen der Gruppen A-H untersucht. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den Homogenaten des thorakalen Rückenmarks und der regionalen Lymphknoten der Tiere unter Verwendung des Extraktionskits der Fa. Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch (260 nm, 280 nm).

2.1.5. Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix-Mikroarray-Technik (diese Untersuchungen wurden von Dr. Dirk Koczan, Institut für Immunologie der Universität Rostock durchgeführt)

RNA-Proben wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) markiert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mit dem MOE430 Gen-Chip (Affymetrix), das eine Kapazität von mehr als 22.000 SONDENSSETS besitzt. Die Hybridisierung sowie das Waschen der Gen-Chips erfolgte wie von Böttcher und Mitarbeitern (2003) beschrieben. Die Intensität der Fluoreszenz wurde mit Laser-Scanning (Hewlett-Packard Gene ScannerTM, Palo Alto, CA, USA) bestimmt. Als Grundlage zur Verarbeitung der Mikroarray-Daten diente die Affymetrix Microarray Suite (MAS) 5.1, um Expressionswerte („Signal“) „Detektion“ und „Change Calls“ sowie zusätzlich die p-Werte für jedes Transkript zu bestimmen. Zur Generierung von Transkript „Detektion“ und p-Werten wurde der Wilcoxon-Test benutzt. Qualitative Signale, wie „Present“ wurden von den p-Werten abgeleitet. Auf der Grundlage der Gesamtintensität wurden die Daten skaliert (Details siehe www.affymetrix.com, statistische Algorithmen in Reference Guide, Part No. 701110 Rev2). Die Daten der MAS Expression wurden mit der Software Suite gEn0M (Glass and Gierl 2002; Bansemer et al. 2003) analysiert. Das erfolgte an vier individuellen mRNA-Proben vom Rückenmark und Lymphknoten aus jeder Tiergruppe (A-H). Von den individuellen „Gen-Signalen“ der Repliken wurden der Medianwert (Zentralwert) errechnet, wenn mindestens drei von vier korrespondierenden „Detektion-Signalen“ vorhanden waren. Für Gruppenvergleiche wurden Medianwerte bestimmt. Die unterschiedliche Expression von Genen wurde als Vielfach-Änderung (fold change) des Expressions-Levels im Vergleich der Tiergruppen ermittelt (siehe Abb. 3 und Abb. 4). Gene wurden als experimentell beeinflusst dann angesehen, wenn sie eine mindestens zweifache Änderungen ihrer Expression aufwiesen. Unsere früheren Mikroarray-Experimente sowie Veröffentlichungen anderer Autoren (Ibrahim et al. 2001; Whitney et al. 2001; Lock et al. 2002; Mix et al. 2002; Böttcher et al. 2003; Denoyelle et al. 2003; Mycko et al. 2003; Nicot et al. 2003; Sturzebecher et al. 2003; Mix et al. 2004; Pahnke et al. 2004) haben gezeigt, dass die zweifache Änderung des Expressionslevels sich als Grenzwert für eine Signifikanzbetrachtung eignet. Die in Abb. 4 gezeigten Ergebnisse repräsentieren die Anzahl der Gene, die im Gruppenvergleich nach dieser Definition signifikant verändert waren.

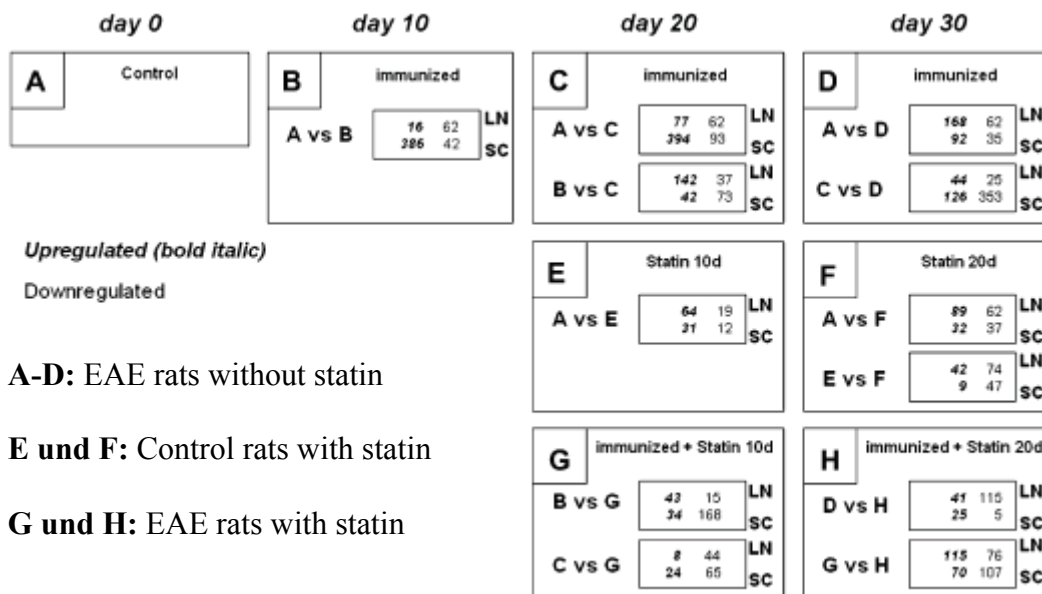


Abb. 4 Änderungen der Genexpression in Lymphknoten (LN) und im Rückenmark (SC) zwischen verschiedenen Tiergruppen. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels Affymetrix Microarray Assay. Die Anzahl der Gene, die im Gruppenvergleich mehr als zweifach hochreguliert waren, sind in Kursivschrift angegeben, die mehr als zweifach herunterregulierten Gene in Normalschrift. So ergab z. B. der Vergleich der EAE-Tiere 10 Tage nach EAE-Induktion (Gruppe B) mit den Kontrolltieren ohne EAE-Induktion und ohne Statinbehandlung (Gruppe A), dass in den Lymphknoten 16 Gene hoch- und 62 Gene herunterreguliert waren. Im Rückenmark betrug die Anzahl der hochregulierten Gene 286 und die der herunterregulierten Gene 42 (entnommen aus Mix et al. 2006). Auf die gezeigten Resultate wird in Abschnitt 3.1.1. des Ergebnisteils näher eingegangen.

2.1.6. Proteinextraktionen aus Lymphknoten und Rückenmark

Zum Vergleich der mit Mikroarray-Technik gewonnenen Ergebnisse wurden Untersuchungen an ausgewählten Genen auf Proteinebene durchgeführt. Dazu wurde die Expression der folgenden vier Genprodukte mit der quantitativen Western-Blot-Methode untersucht (Odyssey-System, LI-COR-Technologie): COX-1, HSP105, ICAM-1 und CD86. Die Expression von zwei Genen (COX-1 und HSP105) war bei Anwendung der Mikroarray-Technik unterschiedlich reguliert. Zwei weitere Gene (ICAM-1 und CD86) wurden in der Literatur als Statin-sensitiv beschrieben (Stuart and Racke 2002; Dedrick et al. 2003; Ledebor et al. 2003; Okouchi et al. 2003; Yilmaz et al. 2004).

Die von den Lymphknoten und vom Rückenmark für die Western-Blot-Untersuchungen entnommenen Proben wurden getrennt in Eppendorf-Reaktionsröhrchen 1,5 ml (V₁₈) bei -80°C aufgenommen. Danach wurden sie mit einem Cocktail von 60 µl - 150 µl Lysispuffer (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Pierce, Rockford, IL, USA) (B₁₀) und 6 µl - 15 µl „Complete Mini“ (10:1) (B₃) lysiert. Die optimale Verdünnung erfolgte nach unseren eigenen Erfahrungswerten. Die Gewebeprobe wurden für die Lyse fünfmal in flüssigem Stickstoff (N₂) für 20 sec eingefroren und unter warmem Wasser wieder aufgetaut. Nach jedem Tauvorgang wurden die Proben gut gemischt,

anschließend zentrifugiert (17.000 x g; 5 min; 20°C) und die Überstände für die Weiterverarbeitungen verwendet. Für die Proteinmessung wurden ein BCA-reagent-Kit (Pierce Chemical Co, Rockford, USA) (B₂), eine 96-Well-Platte (V₃), ein Photometer (G₈) und die Herstellersoftware Easy-win-fitting (S₁) verwendet. Zur Kalibrierung diente eine Standardverdünnungsreihe von Rinderserumalbumin. Aus den Testproben wurden 5 µl entnommen und in 25 µl Aqua dest verdünnt (1:6). Bei hohen Proteinkonzentrationen wurden zusätzlich 1:18 Verdünnungen vorgenommen. Danach erfolgte die Inkubation der 96-Well-Platten bei 37°C für 1h und anschließend die Extinktionsbestimmung im Photometer (G₈). Nach Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration wurden die Testproben durch Zusatz eines gleichen Volumens von 2x Laemmli-Puffer (2% SDS, 10% Glycerol, 5mM EDTA, 62,5mM Tris, 0,025% Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol) (Laemmli 1970) nochmals 1:2 verdünnt, bei 95°C für 5 min denaturiert und bei -20°C gelagert.

2.1.7. Western-Blot (Odyssey-System)

Die Trennung des präparierten Proteingemisches erfolgte durch SDS-Gel-Elektrophorese unter Verwendung eines SDS-Polyacrylamidgels (ready to use, 4-15% Tris-HCl Criterion Precast Gel 1,0 mm; 12+2 Comb, 45 µl, Bio-Rad, München) (B₄). Für die Bestimmung der Testproteine wurden jeweils 5 µg Protein in die Probestaschen des Gels eingebracht. Als Referenzprotein diente das „Housekeeping Protein“ β-Aktin, zu dessen Bestimmung jeweils 2,5 µg Protein in parallele Lanes eingebracht wurde. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von Elektrodenpuffer (L₃) und einer Mini-Elektrophoresekammer (Criterion-Cell, Bio-Rad, München) (G₃), bei konstantem Strom von 120 V und dauerte 1,5-2 Stunden. Als Gelladepuffer wurde 1x Laemmli-Puffer (L₅) benutzt. Als Molekulargewicht-Marker diente ein Prestained-Proteinmarker („Ready-to-use“, peqGOLD Protein-Marker IV, Biotechnologie GmbH, Erlangen) (B₇). Während der Elektrophorese wurden 6 Papierblätter Whatman (3M, Neuss) und eine Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) (V₁₇) im Format 15x7 cm für 30 min - 1 h in Transferpuffer (L₁₂) aktiviert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Transferpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel (B₄) auf die Nitrozellulosemembran (V₁₇). Dazu wurden die Proteine in einer semi-dry-Blotkammer (Bio-Rad) (G₉) unter Verwendung von Transferpuffer (L₁₂) bei konstantem Strom von 0,8 mA/cm² 1,5 h auf eine Nitrozellulosemembran (V₁₇) geblottet. Schließlich wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln in 10 ml Odyssey® Blocklösung (Blockpuffer) (L₇) geblockt. Die Primärantikörper wurden mit der Blocklösung (L₇) verdünnt. Die optimale Verdünnung erfolgte nach eigenen Erfahrungswerten. Die Nitrozellulosemembran wurde mit der Primärantikörper-Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Als Primärantikörper wurden folgende Antikörper benutzt: Anti-CD86 (B7-2), (von der Ratte, gegen Maus, monoklonal, BD Biosciences, Pharmingen), Anti-Cyclooxygenase-1 (COX-1) (vom Kaninchen, gegen Maus, polyklonal, Chemicon, Hofheim), Anti-Interzelluläre Adhäsion Molekül-1 (ICAM-1)

(von der Ziege, gegen Maus, polyklonal, R&D Systems, Wiesbaden), Anti-Hitze-Schock-Protein-105 (HSP105) (von der Ziege, gegen Maus, polyklonal, Santa Cruz, Heidelberg) und Anti- β -Aktin (von der Maus, gegen Maus, monoklonal, Sigma, Taufkirchen). Die benutzten primären Antikörper sind im Anhang A. (Tabelle 6) aufgeführt.

Als nächster Schritt wurde die Membran (V_{17}) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln viermal in 0,1 M PBS (pH7,4) und 0,1% Tween 20 (PBS-T) (L_{11}) gewaschen. Danach wurde sie für 1 Stunde bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln in Perfect WesternTM Containers (G_6) mit dem zweiten Antikörper inkubiert.

Als Zweit-Antikörper wurde fluoreszierendes (i) Alexa Fluor 680 von der Ziege, gegen-Kaninchen IgG; (ii) Alexa Fluor 680 von der Ziege, gegen-Ratte IgG oder (iii) Alexa Fluor 680 vom Esel, gegen-Ziege IgG (alle Molecular Probes, Karlsruhe), verdünnt 1:2 000 mit Odyssey® Blocklösung (L_7), sowie (iv) IRDye 800CW konjugiert, von der Ziege, gegen-Maus IgG (von Rockland, erhalten von BIOMOL, Hamburg) und verdünnt 1:5 000 mit Odyssey® Blocklösung (L_7) verwendet. Die Zweitantikörper sind im Anhang A. (Tabelle 7) aufgeführt. Die optimalen Verdünnungen wurden in Vorversuchen ermittelt. Die Inkubation erfolgte unter Lichtschutz.

Abschließend wurde die Membran (V_{17}) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln und Lichtschutz viermal in 0,1 M PBS (pH7,4) und 0,1% Tween20 (PBS-T) (L_{11}) gewaschen.

Alle Blots wurden in den Kanälen 700 nm für Alexa Fluor 680 gefärbte Antikörper und 800 nm für IRDye 800CW gefärbte Antikörper gescannt. Die Signalstärken wurden unter Verwendung der Odyssey Software Version 1.2 (S_4) gemessen und durch das als Referenzprotein mitgeführte β -Aktin normalisiert.

Die Membranen können bei Bedarf bei 4°C und Lichtschutz in PBS (pH 7,4) (L_{10}) über Wochen bis Monate aufbewahrt werden.

2.2. Untersuchungen in der Zellkultur

2.2.1. Kultivierung der striatalen Vorläuferzellen der Ratte ST14A

Zellkultivierungsbedingungen. Die Zellen wurden als Monolayer in serumhaltigem, komplettem Kulturmedium (DMEM) (L_1) in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ bei permissiver Temperatur von 33 °C sowie bei nicht permissiver Temperatur von 39 °C kultiviert. Die Zellkultur-Volumina variierten zwischen 10 ml pro Petrischale (V_2) und 100µl pro Well in 96-Well-Platten (V_3).

Zellernte. Nach Wachstum bis zur Konfluenz wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Methode geerntet. Dazu wurde Kulturmedium (DMEM) (L_1) aus der 60-mm-Petrischale (V_2) vorsichtig abgesaugt und die Petrischale mit 5 ml steriler kalter phosphatgepufferter Lösung (PBS) (L_8) abgespült. Nach dem Absaugen von PBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA (L_{13}) für 7

Minuten bei 37°C unter mikroskopischer Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde zur Inhibition der Trypsin/EDTA-Lösung die doppelte Menge vom Kulturmedium zugegeben.

Zellsplitting. Konfluente Zellkulturen wurden jeden 2. Tag gesplittet. Nach Zellernte (s. oben) wurde die gesamte Zellsuspension (6 ml) auf drei neue 60-mm-Petrischalen (V_2) verteilt (in jede Schale 2 ml) und jeweils 10 ml Kulturmedium (L_1) zugegeben.

Zellzählung. Für die Zellzählung wurde der Inhalt einer Petrischale (6 ml Zellsuspension) in ein 15 ml „Falcon“ Röhrchen (V_{14}) überführt und (200 x g) 5 min bei RT zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 1 ml DMEM (L_1) resuspendiert. Danach wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (L_{14}) gemischt und in eine Bürker-Zählkammer (G_2) gefüllt. Anschließend wurden die in 25 Kleinquadranten befindlichen ungefärbten vitalen Zellen gezählt. Die Zellzahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor Trypanblau und 10.000 multipliziert, was die Anzahl vitaler Zellen in 1 ml ergab (z.B. $24 \times 2 \times 10^4 = 0,48 \text{ Mill/ml}$).

Zelllagerung. Konfluente Zellkulturen wurden aus 60-mm-Petrischalen (V_2) durch Trypsin/EDTA geerntet (s. oben). Das Zellpellet wurde in 1 ml Gefriermedium (L_4) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen (V_{16}) überführt. Die Kryoröhrchen mussten mindestens 1 Tag bis höchstens 7 Tage bei -80 °C in einem Isolierbehälter aufbewahrt werden. Danach erfolgte eine Überführung der Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff.

Rekultivierung. Eingefrorene Zellen wurden aus dem flüssigem Stickstoff entnommen und in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension (90% FBS + 10% DMSO) wurde in ein 15 ml „Falcon“ Röhrchen (V_{14}) überführt und mit 10 ml kaltem Kulturmedium (L_1) gemischt und zentrifugiert (500 x g, 5 min, RT). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium (L_1) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf im Brutschrank vorgewärmte 60-mm-Petrischalen (V_2) mit je 4 ml Kulturmedium aufgeteilt. Die Kulturschalen wurden über Nacht bei 33° inkubiert. Am nächsten Tag wurden tote Zellen aus der Kultur durch Mediumwechsel entfernt. Anschließend erfolgte die Weiterkultivierung bei 33°C zur Zellvermehrung bzw. bei 39°C den In-Zell-Western-Test.

2.2.2. Zellvitalitätsbestimmung mittels Nissl-Färbung

Zum Ausschluss toxischer Einflüsse von Atorvastatin auf die ST14A-Zellen, wurde die Kresylviolett-Färbung nach Nissl angewendet. Die Nissl-Färbung (genannt nach Franz Nissl, 1860-1919) ist eine histologische Färbtechnik, zur Darstellung der Tigroidschollen in den Nervenzellen.

In jeweils zwei unabhängigen Experimenten wurden 8-kammerige Chamber-Slides (V_{13}) mit 10 000 bzw. 20 000 Zellen pro Kammer gefüllt. Die ST14A-Zellen wurden über 4h, 24h, und 48h mit unterschiedlichen Atorvastatin-Konzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M) sowie Kontroll-Zellen mit PBS (L_8) inkubiert. Die Experimente wurden sowohl bei 33°C (permissiver Temperatur) als auch bei 39°C (nicht-permissiver Temperatur) mit Doppelbestimmungen der experimentellen Ansätze durchgeführt.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen in PBS (L_8) gespült und in 3,7% PFA (pH 3,7) (L_9) 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie erneut zweimal 1 min in PBS (L_8) gespült und nach kurzem Abtropfen, 60 Min in einer Nissl-Lösung (Kresylviolettazetatlösung) (L_6) bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Chamber-Slides zweimal 1 min mit Aqua bidest. gespült und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 1 min in 70%, 80%, 90%) dehydriert. Die Differenzierung erfolgte in 96% Isopropylalkohol. Die Präparate wurden zweimal 5 min in Xylol (B_{11}) gespült und mit Entellan, Neu (B_5) eingedeckt.

Die Zellzählung (10x Objektiv) erfolgte in einem Lichtmikroskop (Zeiss) (G_4), das mit einem Projektionsspiegel ausgestattet war (Abb. 5). Unter dem Projektionsspiegel befand sich ein Leuchttisch, auf den ein Zählgitter (Grid) gelegt war, in welches das mikroskopische Bild projiziert wurde. Das benutzte Grid F3 hat sechs Rahmen mit so genannten „verbotenen“ Linien. Dieses Grid wurde nach Einstellung des auszuwertenden Gesichtsfeldes zufällig unter den Projektionsspiegel platziert. Es wurden die Zellen gezählt, die in den Zählrahmen des Grids lagen, aber ihre linke und untere verbotene Linie nicht berührten. Die Zellen, deren Somata außerhalb der Rahmen lagen, aber die rechte und obere Linie tangential berührten, wurden mitgezählt. Nach der Ermittlung des Mittelwertes wurden die Zelldichte (ZD) pro mm^2 : $ZD = [\text{Zellen} / \text{mm}^2]$ und der Standardfehler ausgerechnet.

$$ZD = \frac{\sum Q^-}{na \times a}$$

Q^- : Treffer (Anzahl der Überlagerungen vom Meßgitter und den auszuwertenden Strukturen)

na: Anzahl der Meßfelder

a: Größe eines Meßfeldes ($0,04 \text{ mm}^2$, 10x Objektiv)

Die Anzahl der auszuwertenden Messgrids wurde nach Gundersen und Jensen (1987) in Form einer Testauswertung bestimmt. Hierzu wurde der coefficient of error (CE) für die Zellzahl berechnet, der mit 9% für die Auswertung von 6 Messgrids deutlich kleiner als der Schwellwert von 25% ist, so dass nicht mehr, sondern eher weniger Messfelder ausgewertet werden mussten. Im Fall einer größeren Variabilität der Zelldichten in den Präparaten, würde der CE bei gleichbleibender Anzahl der ausgewerteten Messgrids größer sein. Der Atorvastatin-Effekt wird im Ergebnisteil in Prozent der Kontrollwerte angegeben.

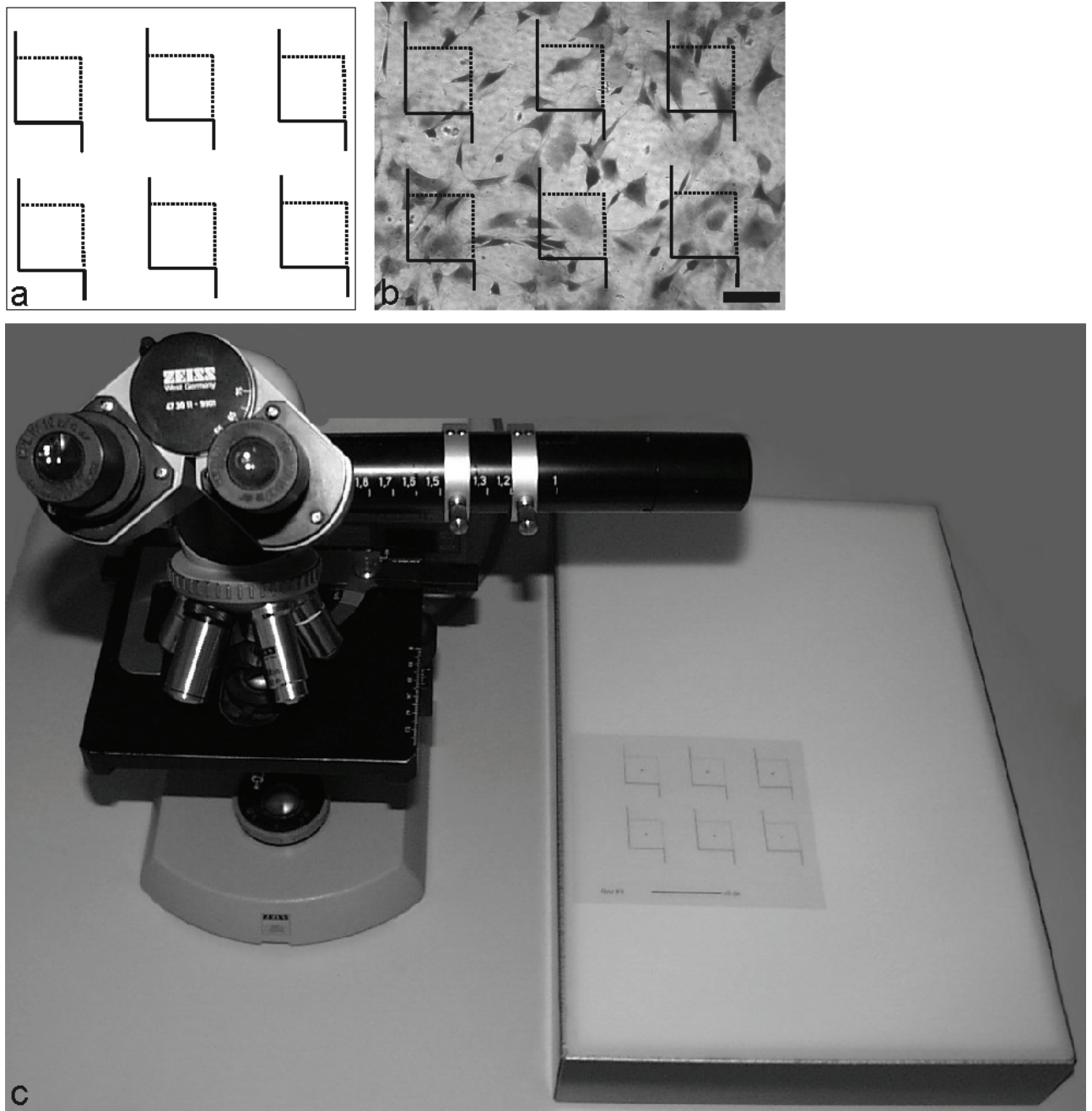


Abb. 5 Stereologische Auswertung von zytologischen Präparaten
a) Grid für Zellzählung (Grid F3);
b) Mikroskopisches Bild mit projiziertem Grid Maßstab: 100 μm ;
c) Mikroskop mit dem Projektionsspiegel und Leuchttisch.

2.2.3. In-Zell-Western-Analyse

Die von LI-COR[®] Bioscience (Lincoln, Nebraska) entwickelte In-Zell-Western-Methode ermöglicht die quantitative Analyse der Proteinexpression in Zellkulturen, Gewebeschnitten und in vivo. Für die vorliegenden Experimente wurden die adhärenenten Zellen in Mikrotiterplatten fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern. Die Sekundärantikörper sind dabei mit Infrarotfarbstoffen konjugiert. Im Gegensatz zur traditionellen Einkanal-detektion arbeiten LI-COR[®] Systeme mit zwei klar voneinander separierten Fluoreszenzkanälen (700 nm und 800 nm). Diese ermöglichten den simultanen Nachweis von zwei Zielstrukturen. Damit kann (a) der Durchsatz gesteigert, (b) die Genauigkeit der Daten erhöht und (c) eine exakte Quantifizierung durchgeführt werden. Eine entscheidende Voraussetzung für die präzise Bestimmung der Proteinmenge ist die Normalisierung der Daten, die mit Hilfe des Fluoreszenzkanals die Variation der Zellzahl der Probe korrigiert. Im zweiten Schritt wird das Fluoreszenzsignal im zweiten Kanal quantitativ erfasst, wo das Signal nach Korrektur von unspezifischem Hintergrundrauschen gegen die unterschiedliche Zellzahl pro Well normalisiert wird. Die Signalerfassung im infraroten Wellenlängenbereich ist für Nachweisverfahren eine wichtige Voraussetzung. Zellen, Kunststoffreaktionsgefäße und -platten sowie Wirkstoffe können im sichtbaren Fluoreszenzbereich eine signifikante Autofluoreszenz aufweisen. Dieses unspezifische Hintergrundsignal ist im Infrarotbereich stark verringert, was zu einer deutlich höheren Sensitivität und Leistungsfähigkeit des LI-COR[®] Systems führt.

Mit dieser Methode wurden die striatale Vorläuferzellen der Ratte ST14A untersucht. Dazu wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Zellen bei permissiver Temperatur von 33°C sowie bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C in unterschiedlichen Zeitabständen (4 h, 24 h, 48 h) mit verschiedenen Atorvastatin-Konzentrationen (10^{-5}M , 10^{-6}M und 10^{-7}M) analysiert. Jeder experimentelle Ansatz erfolgte als Dreifachbestimmung.

Die Vorbereitung der Zellen zur Aussaat in 96-Well-Platten erfolgte wie im Abschnitt 2.2.1. beschrieben.

Die Konzentration der Zellen wurde so eingestellt, dass in jeder Vertiefung der 96-Well-Platte (V_3) 200 μl 20 000 Zellen erhielten. Anschließend wurden die Zellen bei permissiver Temperatur von 33°C und nicht-permissiver Temperatur von 39°C 4 h, 24 h und 48 h mit den drei Atorvastatin-Konzentrationen inkubiert (Inkubationsschema siehe Abb. 6).

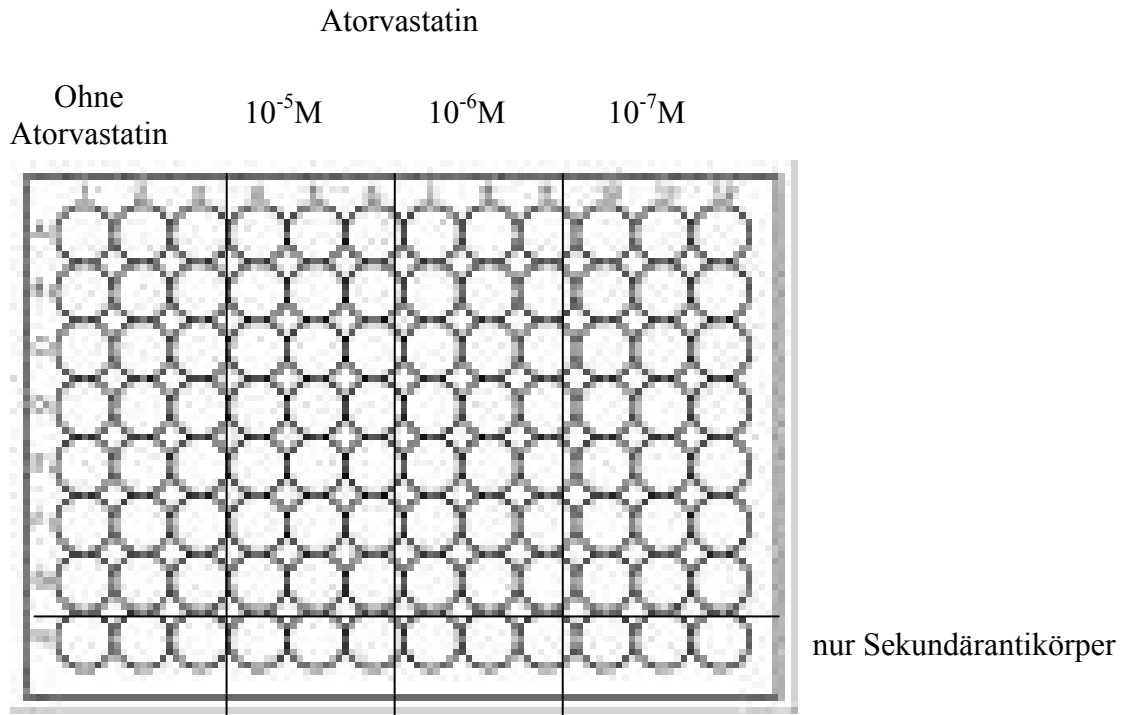


Abb. 6 Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte für die In-Zell-Western-Methode. Die Konzentration der Zellen wurde so eingestellt, dass in jeder Vertiefung der Dreifachansätze 200 μl mit 20 000 Zellen enthalten sind. Anschließend wurden die Zellen bei permissiver Temperatur von 33°C oder nicht-permissiver Temperatur von 39°C 4 h, 24 h oder 48 h mit den drei Atorvastatin-Konzentrationen (10^{-5}M , 10^{-6}M und 10^{-7}M) bzw. ohne Atorvastatin inkubiert, fixiert und gefärbt. Die Kontrolltripletts, die nur mit fluoreszierenden sekundären Antikörpern behandelt wurden, sind in der unteren Reihe dargestellt.

Nach Beendigung der Inkubation wurde das Kulturmedium (L_1) aus der 96-Well-Platte (V_3) unter Verwendung einer Multi-Kanal-Pipette (V_{15}) abgesaugt, wobei das Kulturmedium nur auf die Kammerwand aufgetragen wurde, um die am Boden fixierten Zellen nicht zu verlieren.

Danach wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS 20 min bei Raumtemperatur ohne Schütteln fixiert.

Die Fixierungslösung setzt sich wie folgt zusammen:

45 ml	1x PBS
5 ml	37% Formaldehyd
Insgesamt 50 ml	3,7% Formaldehyd

Mittels einer Multi-Kanal-Pipette (V_{15}) wurden 150 μl frische Fixierungslösung bei Raumtemperatur in jedes Well gefüllt. Anschließend wurde die Fixierungslösung aus der 96-Well-Platte unter Verwendung von einer Multi-Kanal-Pipette in einen speziellen Abfallcontainer abgesaugt.

Danach erfolgte die **Zell-Permeabilisierung**, wozu die 96-Well-Platte viermal mit 1x PBS + 0,1% Triton X-100 5 min gespült wurde.

Die Permeabilisierungslösung wurde wie folgt angesetzt:

495 ml	1x PBS
5 ml	10% Triton X-100

Unter Verwendung einer Multi-Kanal-Pipette (V_{15}) wurden 200 μ l frische Permeabilisierungslösung in jedes Well gegeben. Die Permeabilisierung erfolgte bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln.

Danach war es wichtig, die Zellen nicht trocknen zu lassen und sofort eine neue Spüllösung zuzugeben. Als nächstes wurden die Zellen 1 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln mit LI-COR Odyssey® Blockpuffer (L_7) inkubiert. Mittels einer Multi-Kanal-Pipette wurden 150 μ l LI-COR Odyssey® Blockpuffer in jedes Well gefüllt und anschließend der LI-COR Odyssey® Blockpuffer abgesaugt.

Für Kontroll-Inkubationen unter Weglassen des Primärantikörpers wurde der LI-COR Odyssey® Blockpuffer (L_7) nicht abgesaugt. Die Zellen wurden hier bis zur Zugabe des zweiten Antikörpers nur mit dem LI-COR Odyssey® Blockpuffer inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit primären Antikörpern inkubiert, die mit LI-COR Odyssey® Blockpuffer (L_7) (1:50) verdünnt waren. Die optimalen Verdünnungen wurden in Vorversuchen bestimmt. Mittels einer Multi-Kanal-Pipette (V_{15}) wurde 50 μ l der primären Antikörper-Verdünnung in die Wells gegeben. Die Inkubation erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln.

Die benutzten primären Antikörper sind im Anhang A. (Tabelle 8) aufgeführt.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörpern wurde die 96-Well-Platte (V_3) viermal für 5 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln mit 1 x PBS + 0,1% Tween-20 (L_{11}) gespült.

Die Tween Waschlösung wurde wie folgt vorbereitet:

995 ml	1 x PBS
5ml	20% Tween-20

Die sekundären Antikörper wurden in Odyssey Blocking Puffer (L_7) unter Lichtschutz (1:200) verdünnt. Die optimale Verdünnung der Antikörper erfolgte nach Vorversuchen.

Mittels einer Multi-Kanal-Pipette (V_{15}) wurden 50 μ l der sekundären Antikörper Verdünnungen in die Wells gegeben. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Beim Inkubieren musste die Platte vor Licht geschützt werden!

Die Zweitantikörper sind im Anhang A. (Tabelle 9) aufgeführt.

In der Folge wurde die 96-Well-Platte (V_3) viermal 5 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit 1 x PBS + 0,1% Tween-20 (L_{11}) gespült. Dafür wurden mittels einer Multi-Kanal-Pipette 200 μ l Tween Waschlösung pro Well bei Raumtemperatur zugegeben. Beim Waschen musste die Platte vor Licht geschützt werden!

Abschließend wurde die 96-Well-Platte in den Kanälen 700 nm für Alexa Fluor 680 gefärbte Antikörper und 800 nm für IRDye 800CW gefärbte Antikörper gescannt. Die Messung an Signalstärken erfolgte unter Verwendung der Odyssey Software Version 1.2 (S_4). Sie wurden gegen das als Referenzprotein mitgeführte β -Aktin normalisiert.

Die Fluoreszenzsignale blieben mehrere Wochen stabil.

Zur Aufbewahrung wurden mittels einer Multi-Kanal-Pipette (V_{15}) 200 μ l PBS (pH7,4) (L_{10}) pro Well zugegeben. Die Lagerung der Platten erfolgte unter Lichtschutz bei 4°C oder -20°C.

2.3. Statistik

Die Statineffekte wurden auf statistische Signifikanz durch Mittelwertvergleich der integrierten Fluoreszenzintensitäten von Proben mit und ohne Atorvastatinexposition im Student's t-Test geprüft. Die Signifikanzschwelle wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Statineffekte in der EAE in vivo

3.1.1. Genexpression (Mikroarray-Analyse)

Um eine möglichst vollständige Identifizierung der Gene vornehmen zu können, deren Expression im Krankheitsverlauf der EAE von Statinen beeinflusst werden, erfolgte eine Mikroarrayanalyse der Genexpression in Lymphknoten und Rückenmark von Atorvastatin-behandelten EAE-Mäusen zu vier verschiedenen Zeitpunkten. Diese lagen vor der EAE-Induktion (Tag 0), in der Initialphase der Erkrankung (Tag 10), auf dem Krankheitshöhepunkt (Tag 20) und in der Remissionsphase (Tag 30) durchgeführt. Zum Vergleich wurden zu den gleichen Zeitpunkten Atorvastatin-behandelte Kontrollmäusen untersucht. Die Analyse umfasste 12.000 Gene. Eine um das Zweifache geänderte Expression im Vergleich zweier Tiergruppen wurde in Übereinstimmung mit den meisten Literaturmitteilungen und vorausgegangenen eigenen Mikroarray-Untersuchungen in anderen Systemen als signifikant angesehen. Die Ergebnisse der Vergleichsanalyse zwischen den verschiedenen Tiergruppen sind in Abb. 4 zusammengestellt, die bereits im Abschnitt 2.1.5. des Kapitels Material und Methoden gezeigt wurde. Daraus ist ersichtlich, dass die höchste Anzahl hochregulierter Gene (386 bzw. 394) 10 bzw 20 Tage nach EAE-Induktion im Rückenmark auftrat. Atorvastatin beeinflusste jedoch mehr Gene in den Lymphknoten als im Rückenmark. Die Mehrzahl der regulierten Gene war generellen Zellfunktionen zuzuordnen wie Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur, Gentranskription, Proteinprozessierung, Signaltransduktion, Auf- und Umbau des Zytoskeletts sowie Reaktion auf oxidativen Stress. Die vollständige Liste aller regulierten Gene findet sich im Supplement der Veröffentlichung von Mix und Mitarbeitern (2006) und ist im Internet unter doi: 10. 10. 16/ j. jaut. 2006. 09. 006 abrufbar. Überraschenderweise waren auch einige ZNS-Gene in Lymphknoten exprimiert, wobei die Mehrzahl von ihnen durch Atorvastatinbehandlung hochreguliert wurde, und zwar sowohl in der EAE- als auch in der Kontrolltiergruppe.

Bei 14 Genen war die Expressionsänderung ausschließlich durch die Atorvastatinbehandlung und nicht durch die EAE-Induktion bedingt. Diese Gene sind in Tab. 4 aufgeführt. Fünf von ihnen waren nur in EAE-Mäusen beeinflusst, 9 sowohl in EAE- als auch in Kontrollmäusen. Hinsichtlich ihrer Funktion hatte die Hälfte der 14 Gene eine Beziehung zur Zelladhäsion (Thrombospondin-1 (TSP-1), Connexin-43, Galectin-3 und Dectin-1) oder zur Chemokin/Zytokin-vermittelten Zellmigration (Pentraxin-3 (PTX-3), suppressor of cytokine

signaling-3 (SOCS-3) und CCL-11). Andere codierten für die B-Zellmarker CD28 und CD79B, die Enzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Carboanhydrase-3 (CAR-3), das Ca⁺⁺-bindende Signalmolekül S100-A4, das Hitzeschockprotein HSP105 und das Peptidhormon Inhibin-1. Die Mehrzahl dieser Atorvastatin-sensitiven Gene (12/14) war in EAE-Mäusen hochreguliert, entweder in den Lymphknoten (TSP-1, CCL-11 und HSP105 nach 20 Tagen Atorvastatinbehandlung) oder im Rückenmark (CD20, CD79B und CAR-3 nach 10 Tagen Atorvastatinbehandlung und Galectin-3, Dectin-1, SOCS-3, S100-A4 und CAR-3 nach 20 Tagen Atorvastatinbehandlung) oder in beiden Geweben (PTX-3 nach 20 Tagen Atorvastatinbehandlung). Nur Connexin-43 und COX-1 waren ausschließlich herunterreguliert, und zwar in den Lymphknoten nach 10 Tagen Atorvastatinbehandlung. Bei den Kontrollmäusen waren nahezu alle Atorvastatin-sensitiven Gene (8/9) hochreguliert, und zwar hauptsächlich in den Lymphknoten.

Tabelle 4. Zusammenstellung der Gene, deren Expression bei EAE-Mäusen und/oder Kontrolltieren selektiv durch die Behandlung mit Atorvastatin verändert war (entnommen aus Mix et al. 2006).

Gene	Accession no.	Direction of change in EAE mice	Time of Atorvastatin treatment (days)	Tissue	Direction of change in control mice	Time of Atorvastatin treatment (days)	Tissue	Functional group
Thrombospondin-1 (TBS-1)	AI385532	<i>Up</i>	20	ln ^a	<i>Up</i>	10	ln	Adhesion molecules/ adhesion regulators
Connexin-43	NM_010288	Down	10	ln	<i>Up</i>	10	ln	
Galectin-3	X16834	<i>Up</i>	20	sc ^b	Down	20	sc	
		Down	10	sc				
Dectin-1	NM_020008	<i>Up</i>	20	sc				
Pentraxin-3 (PTX-3)	NM_008987	<i>Up</i>	20	ln, sc	<i>Up</i>	10	ln	Cytokines/chemokines/ cytokine regulators
		Down	10	ln, sc		20	ln	
Suppressor of cell signaling-3 (SOCS-3)	NM_007707	<i>Up</i>	20	sc	<i>Up</i>	10	ln, sc	
Chemokine (CC motif) ligand-11 (CCL-11)	NM_011330	Down	10	sc		20	ln	
		<i>Up</i>	20	ln	<i>Up</i>	10	ln	
B cell marker CD20	BE686578	<i>Up</i>	10	sc				B cell molecules
B cell receptor component CD79B	NM_008339	<i>Up</i>	10	sc				
Cyclooxygenase-1 (COX-1)	NM_008969	Down	10	ln				Metabolic enzymes
Carbonic anhydrase-3 (CAR-3)	AK003671	<i>Up</i>	10	sc	<i>Up</i>	20	sc	
			20	sc				
Ca ⁺⁺ -binding protein S100-A4	D00208	<i>Up</i>	20	sc				Signaling molecules
Heat shock protein-105 (HSP-105)	BI499717	<i>Up</i>	20	ln	<i>Up</i>	20	ln	Stress molecules
Inhibin-B1	BB353211	<i>Up</i>	20	ln	<i>Up</i>	10	ln	Hormones
		Down	10	ln				
			10	sc				

^a ln = lymph nodes.

^b sc = spinal cord.

3.1.2. Proteinexpression (Western-Blot-Analyse)

Um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf der Proteinebene zu verifizieren und mögliche Veränderungen der Expression von Proteinen durch die Atorvastatinbehandlung zu erfassen, bei denen keine signifikante Genexpressionsänderung gefunden wurde, solche aber auch in der Literatur als Statin-sensitiv bekannt sind, wurde eine quantitative Western-Blot-Analyse durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden aus der Genexpressionsanalyse HSP105 und COX-1 sowie aus der Literatur das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 und das Lymphozytenfunktionsmolekül CD86 ausgewählt. Die Abbildungen 7-9 zeigen beispielhaft die Blotergebnisse für ICAM-1. Die Western-Blots der Proteine HSP105, COX-1 und CD86 sind im Anhang B widergegeben.

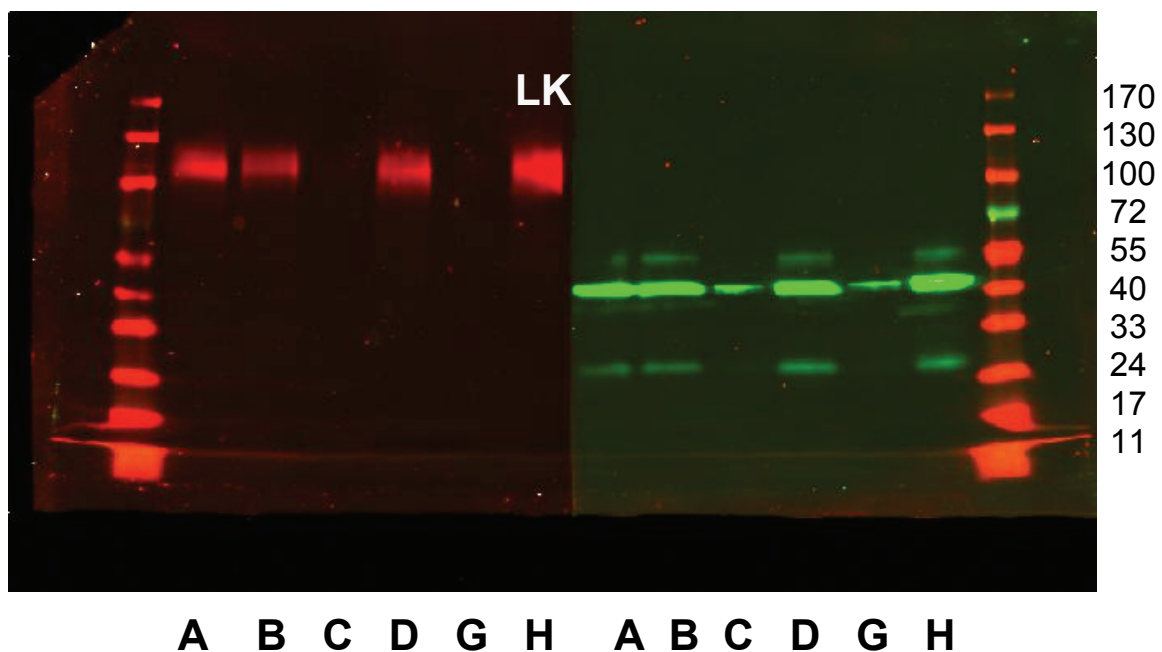


Abb. 7 Proteinexpression von ICAM-1 in Lymphknoten (LK) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A-D = 0, 10, 20 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A-D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10. – 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für ICAM-1 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

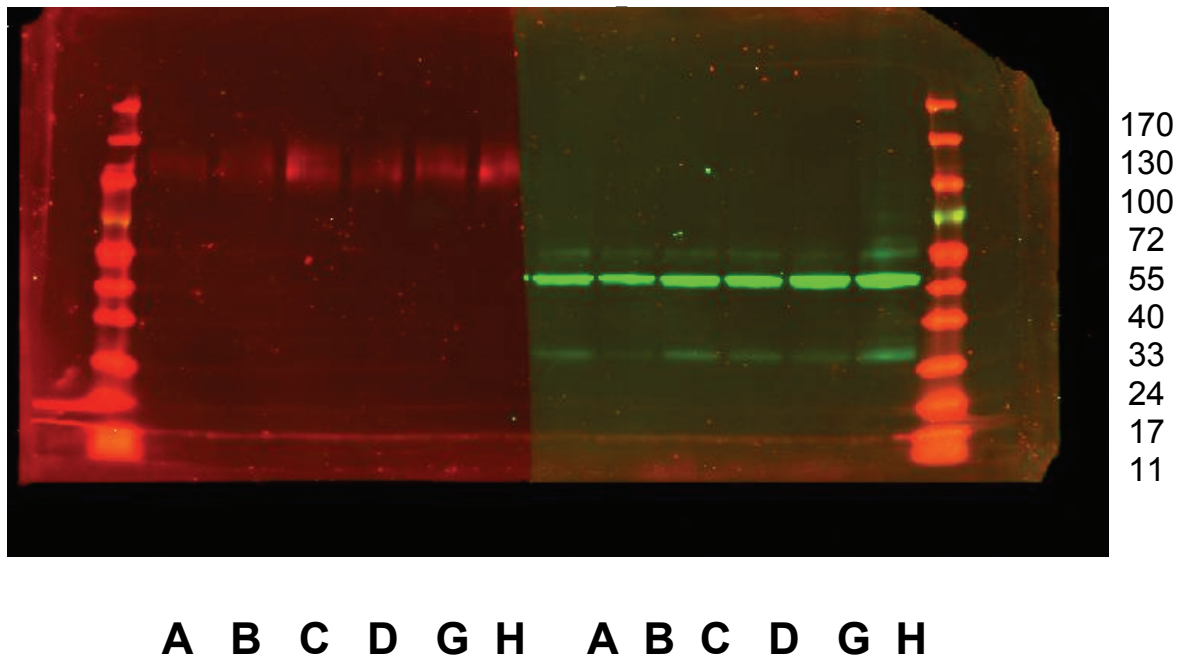


Abb. 8 Proteinexpression von ICAM-1 im Rückenmark (RM) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A-D = 0, 10, 20 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A-D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10. – 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für ICAM-1 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

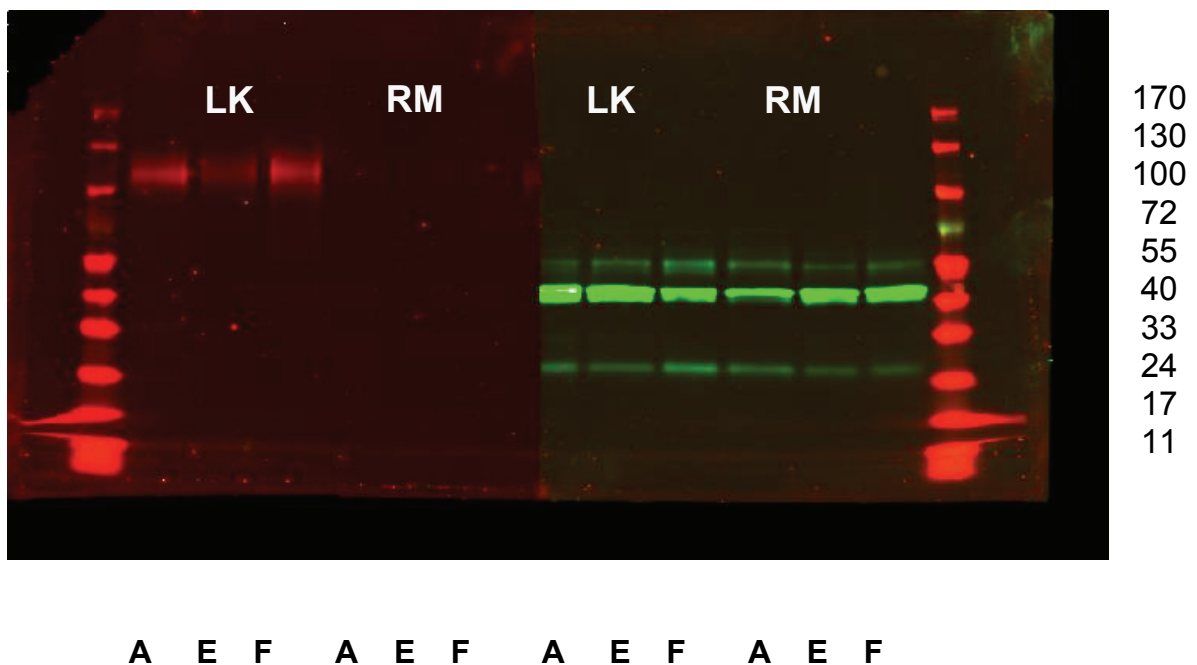
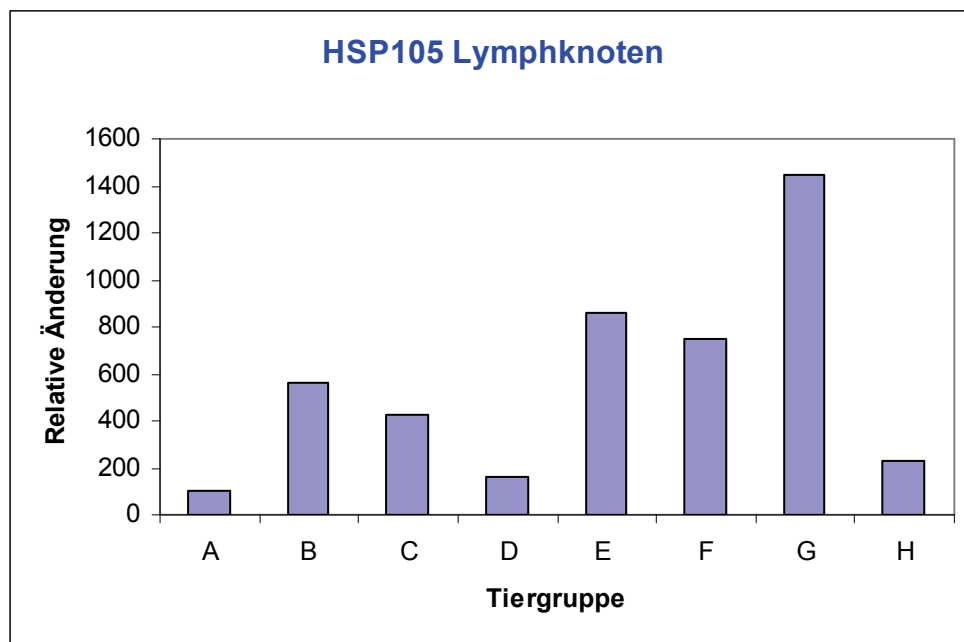
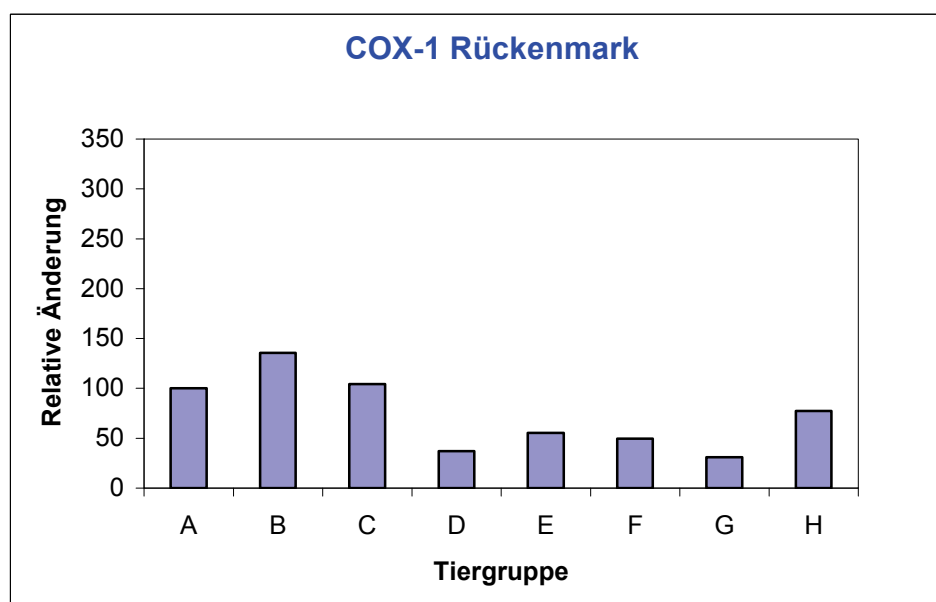
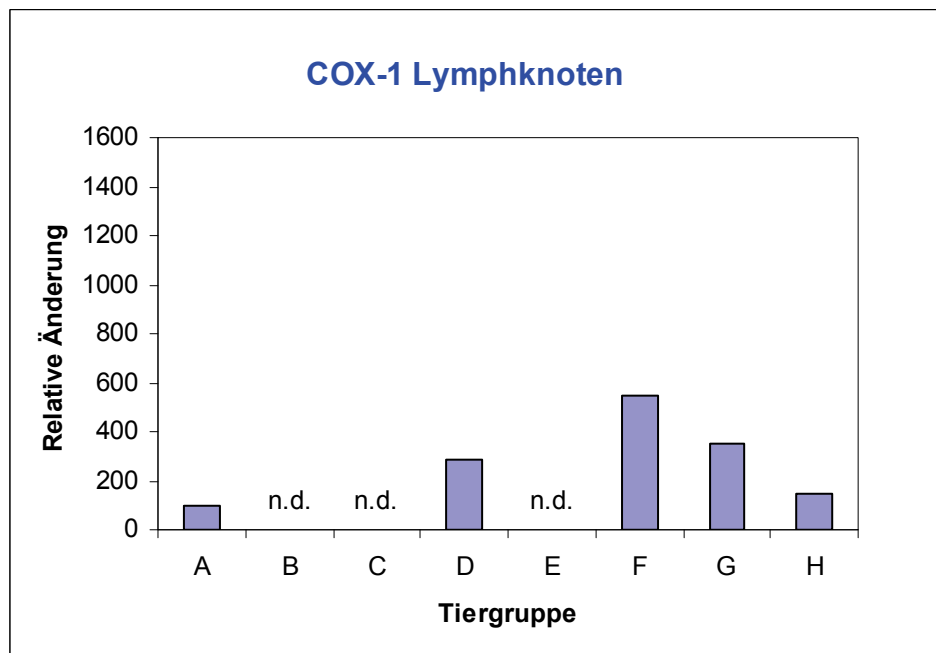
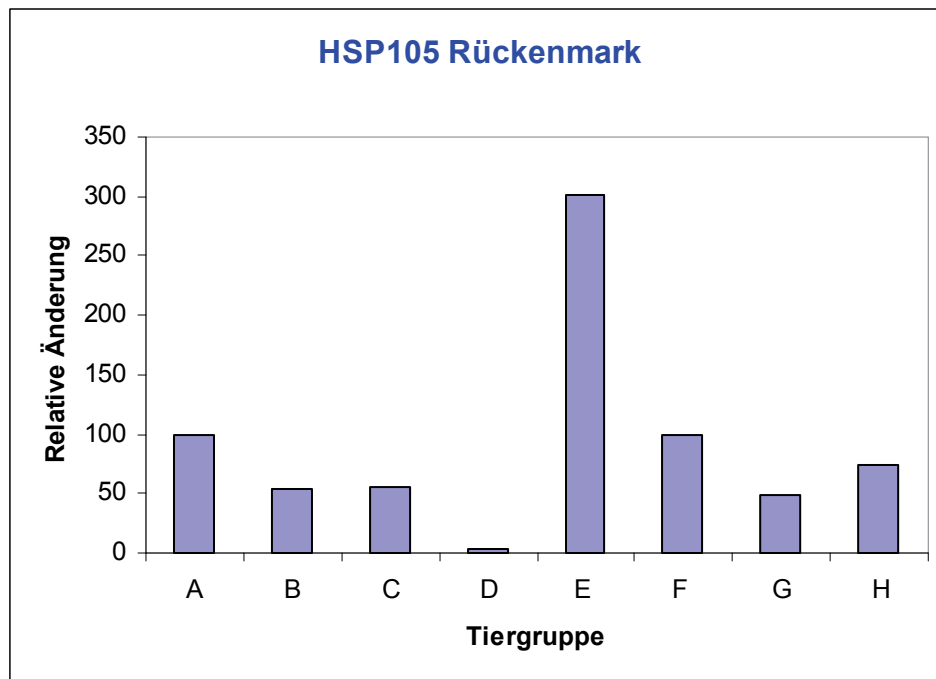


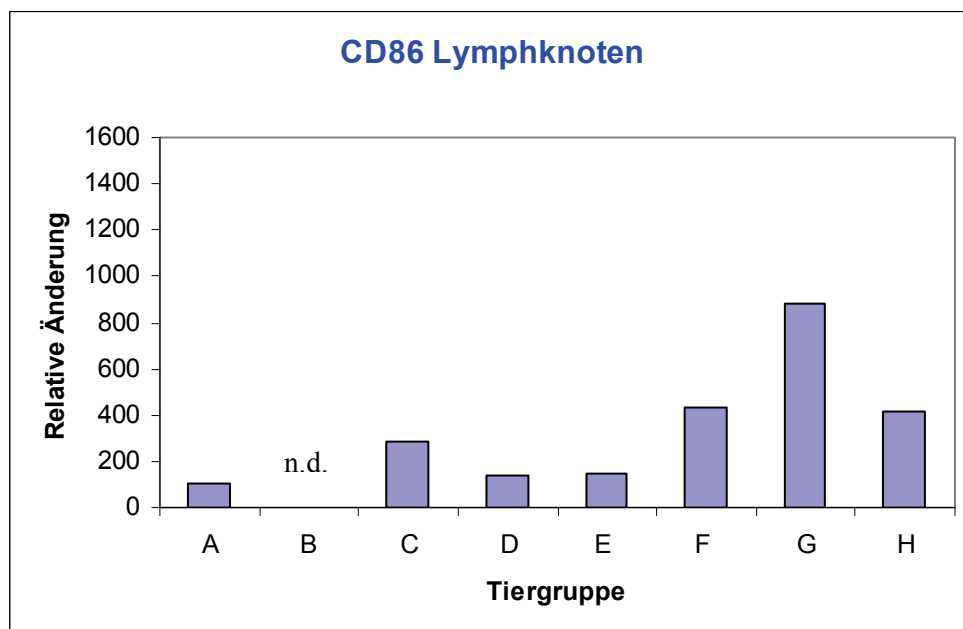
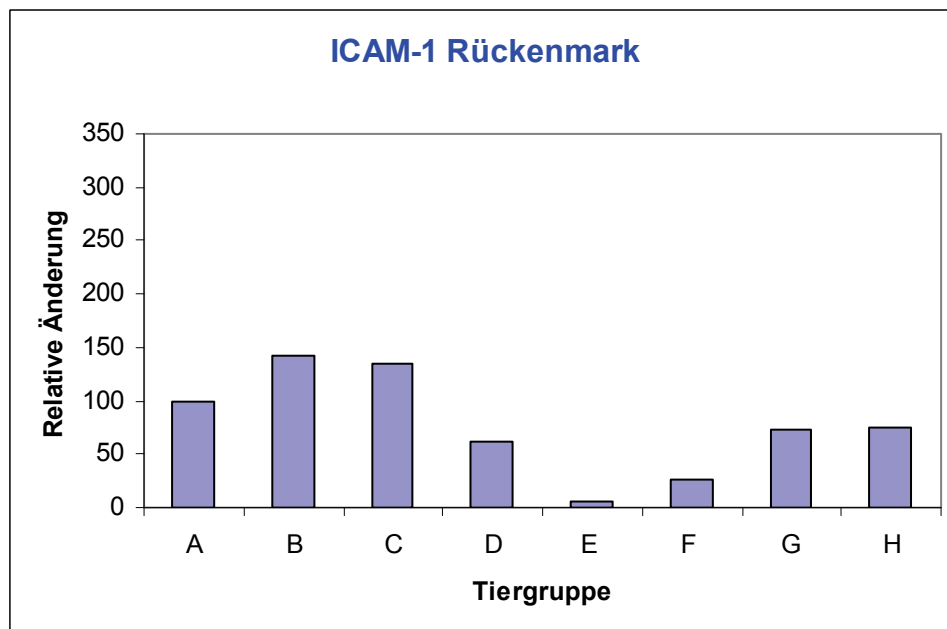
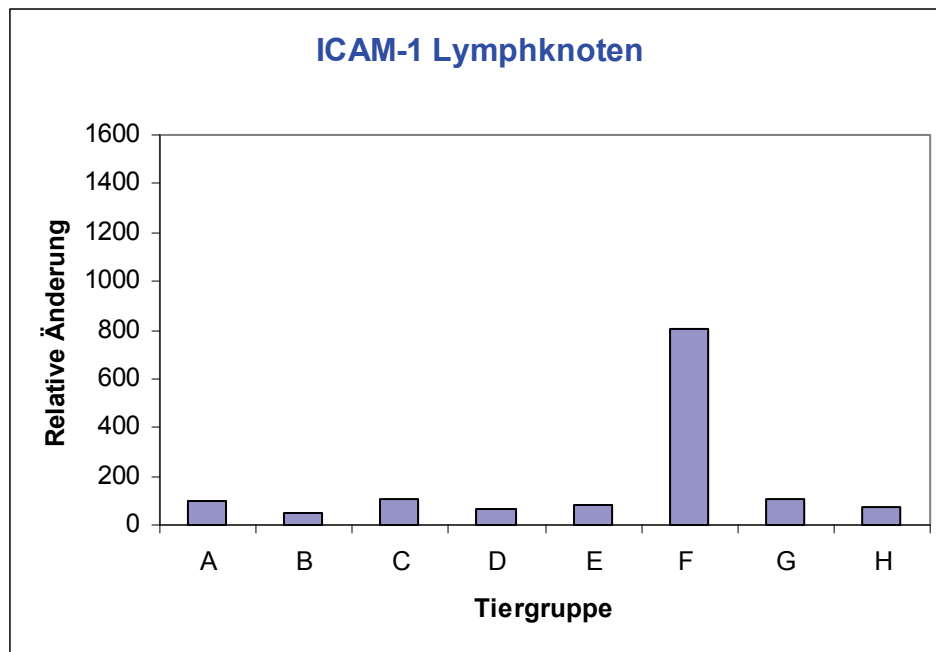
Abb. 9 Proteinexpression von ICAM-1 in Lymphknoten (LK) und im Rückenmark (RM) von Kontrollmäusen ohne Atorvastatinbehandlung (A) und mit Atorvastatinbehandlung (E = 10 Tage Behandlung, F = 20 Tage Behandlung). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte

mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für ICAM-1 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

Für jede Proteinanalyse wurden 6 Gewebsextrakte aus 6 verschiedenen Mäusegruppen zweifach auf ein Gel aufgetragen, auf der linken Seite zur Analyse des Zielproteins (hier ICAM-1) und auf der rechten Seite zur Analyse des Referenzproteins β -Aktin. Nach der elektrophoretischen Auftrennung des Proteingemisches und dem Proteintransfer auf die Blotmembran wurde diese geteilt, um die beiden Proteine getrennt mit den komplementären Antikörpern detektieren zu können. Die Bandenstärken wurden über die Messung der integrierten Fluoreszenzintensität quantifiziert und die Werte für das Zielprotein (hier ICAM-1) durch Division durch die korrespondierenden Werte des Referenzproteins β -Aktin normiert.







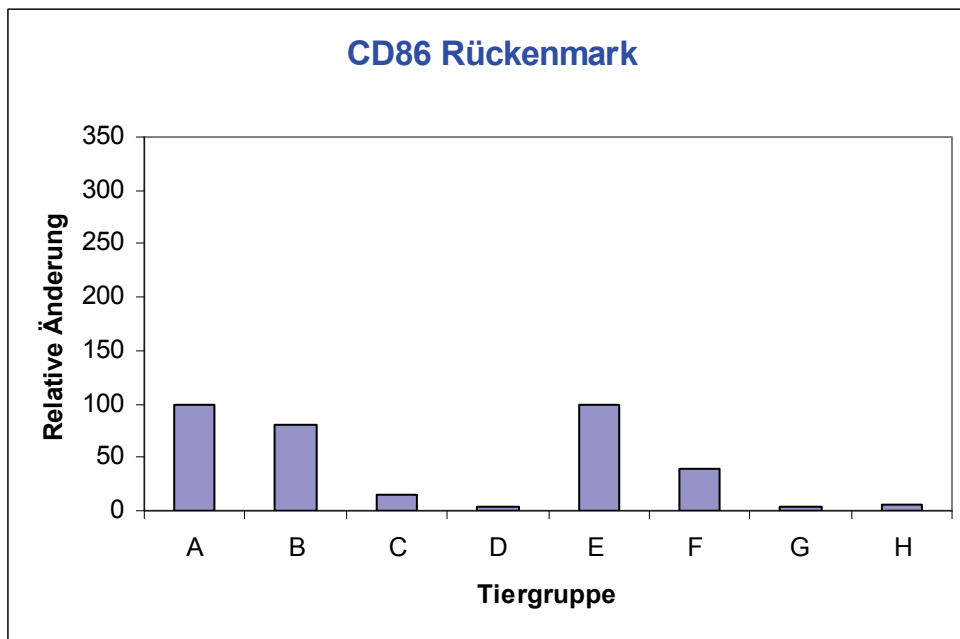


Abb. 10 Quantitative Veränderungen der Proteinexpression von HSP105, COX-1, ICAM-1 und CD86 in Lymphknoten (LK) und Rückenmark (RM) von EAE-Mäusen (Tiergruppen B-D und G-H) und Kontrollmäusen (E-F) mit Atorvastatinbehandlung (E: 10 Tage, F: 20 Tage, G: 10 Tage und H: 20 Tage) und ohne Atorvastatinbehandlung (A: Kontrollmäuse, B-D: EAE-Mäuse 10, 20 bzw. 30 Tage nach EAE-Induktion). Eine schematische Darstellung der Behandlungsarten befindet sich im Abschnitt 2.1.2. (Abb. 3). Als Maß der Proteinexpression diente die integrierte Fluoreszenzintensität der mittels quantitativer Western-Blot-Methode detektierten und in den Abbildungen 7-9 veranschaulichten Proteinbanden (Einzelheiten der technischen Durchführung siehe Abschnitt 2.1.7.). Die Ergebnisdarstellung erfolgte als relative Änderung im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollmäusen (Tiergruppe A), deren normalisierte Fluoreszenzwerte jeweils auf 100% gesetzt wurden. Der jeweilige Atorvastatineffekt ergibt sich daher durch den Vergleich folgender Tiergruppen: E vs A, F vs A (Effekt in Kontrollmäusen), G vs C und H vs D (Effekt in EAE-Mäusen). „n. d.“ bedeutet „nicht durchgeführt“.

Die Ergebnisdarstellung für alle untersuchten Proteine erfolgt als Angabe der jeweiligen Veränderungen der Proteinexpression zwischen den Tiergruppen (Abb. 10). Dabei dient die Gruppe A der unbehandelten Kontrolltiere als Vergleichsgruppe für alle anderen Tiergruppen. Die Proteinexpressionswerte der Gruppe A sind deshalb jeweils auf 100% gesetzt. Da in 4 Fällen nicht genügend Lymphknotengewebe für die Analyse vorhanden war, fehlen in der Tiergruppe B der Wert für CD86 und in den Tiergruppen B, C und E die Werte für COX-1. Das erste auffällige Ergebnis waren die teilweise erheblich größeren

Proteinexpressionsänderungen in den Lymphknoten im Vergleich zum Rückenmark (vergleiche den unterschiedlichen Größenbereich der Ordinaten in den Säulendiagrammen der Lymphknoten mit dem des Rückenmarks). Das galt sowohl für den Einfluss der EAE-Induktion als auch der Atorvastatinbehandlung.

Von den untersuchten Proteinen zeigte HSP105 die stärksten Veränderungen. Durch die EAE-Induktion wurde es in den Lymphknoten hochreguliert und im Rückenmark herunterreguliert (Gruppen B-D). Die Atorvastatinbehandlung bewirkte in den Lymphknoten nach 10 Tagen eine zusätzliche transiente Hochregulation (G vs C), während der Effekt im Rückenmark marginal blieb. Auch bei den Kontrollmäusen hatte die Atorvastatinbehandlung die HSP105-Expression in den Lymphknoten erheblich gesteigert (auf das 6-8-fache, Gruppen E-F), im Rückenmark allerdings weniger (ca. 3-fach) und nur nach 10 Tagen (Gruppe E). Die stärkere HSP105 steigernde Atorvastatinwirkung in den Lymphknoten gegenüber dem Rückenmark steht in Übereinstimmung mit den Genexpressionsbefunden. Allerdings erfolgte dort die Hochregulation in den EAE-Lymphknoten im Gegensatz zur Proteinexpression erst nach 20 Tagen Atorvastatinbehandlung (korrespondierend zu Gruppe H).

Die COX-1-Proteinexpression war durch die Atorvastatinbehandlung im Rückenmark der EAE-Mäuse nach 10 Tagen (Gruppe G vs C) und in den Kontrollmäusen nach 10 und 20 Tagen (Gruppen E-F) erniedrigt. Aussagen über die Atorvastatinwirkung in den EAE-Lymphknoten sind wegen fehlender Vergleichswerte (Gruppe B und C) erschwert. Der Vergleich der Werte nach 20 Tagen Atorvastatinbehandlung (H vs D) spricht für eine leichte suppressorische Wirkung. Bei Kontrollmäusen steigerte die 20-tägige Atorvastatinbehandlung allerdings die COX-1-Expression (Gruppe F). Die Korrelation mit der Genexpression bei der eine Suppression in EAE-Lymphknoten und 10-tägiger Atorvastatinbehandlung gefunden wurde, muss wegen des fehlenden Gruppe C-Wertes offen bleiben.

Die ICAM-1 Expression war in EAE-Mäusen sowohl in den Lymphknoten als auch im Rückenmark im wesentlichen Atorvastatin-unabhängig. Lediglich die 10-Tage-Behandlung führte im Rückenmark zu einer leichten Suppression (G vs C). Auffällig war jedoch die etwa 8-fache Hochregulation in den Lymphknoten der Kontrollmäuse nach 20-tägiger Atorvastatinbehandlung (Gruppe F), was zu einer Herabregulierung im Rückenmark der gleichen Tiergruppe kontrastierte.

Das vierte im Western-Blot untersuchte Protein, CD86, war im Verlauf der EAE in den Lymphknoten transient um das 3-fache hochreguliert (Gruppe C) und im Rückenmark im Zeitverlauf zunehmend supprimiert (Gruppen B-D). In den Lymphknoten der EAE-Mäuse trat ein stimulierender Atorvastatineffekt auf (Gruppen G-H vs C-D). Er zeigte sich aber auch nach 20-tägiger Behandlungsdauer bei den Kontrollmäusen (Gruppe F). Im Gegensatz dazu bestand der einzige auffällige Atorvastatineffekt im Rückenmark bei den Kontrollmäusen in einer ca. 50%-igen Suppression nach 20-tägiger Behandlung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression der 4 untersuchten Proteine sowohl in Lymphknoten als auch im Rückenmark der Versuchstiere durch die Induktion der EAE und mehr noch durch die Atorvastatinbehandlung beeinflusst war und dass das Ausmaß der Expressionsänderungen von der Dauer der EAE und der Statinbehandlung abhing. Außerdem erwiesen sich die Proteine auch in gesunden Kontrollmäusen als Statin-sensitiv. Insgesamt zeigte sich ein heterogenes Bild der Proteinexpressionsänderungen und welche nur partiell die in der Mikroarray-Analyse gefundenen Änderungen auf Transkriptionsebene widerspiegeln.

3.2. Statineffekte auf die neurale Vorläuferzelllinie ST14A in vitro (In-Zell-Western-Analyse)

3.2.1. Vitalität von ST14A-Zellen nach Statinexposition

Entsprechend der Zielstellung der vorliegenden Arbeit sollten in Ergänzung zu den In-vivo-Untersuchungen im EAE-Modell Atorvastatineffekte auf die Expression von Kandidatenproteinen in neuronalen Vorläuferzellen *in vitro* untersucht werden, um Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung regenerativer Prozesse im Nervengewebe durch Statine zu erhalten. Als Modellzellen für die Testung dienten striatale Vorläuferzellen der Ratte (ST14A), die unter permissiven Kultivierungsbedingungen, d. h. bei einer Inkubationstemperatur von 33°C, proliferierten und unter nicht-permissiven Kultivierungsbedingungen, d.h. bei einer Inkubationstemperatur von 39°C, in die Differenzierung eintraten.

Zunächst war es erforderlich, sinnvolle Atorvastatin-Testkonzentrationen zu ermitteln. Ausgehend von Literaturmitteilungen wurde als höchste Testkonzentration 10^{-5} M ausgewählt und diese um zweimalige 1:10-Verdünnungen ergänzt, um einen möglichst weiten Konzentrationsbereich zu erfassen. In einem ersten experimentellen Schritt waren mögliche

toxische Effekte auf die zu untersuchenden Zellen zu bestimmen, und zwar sowohl unter Proliferationsbedingungen als auch unter Differenzierungsbedingungen. Damit sollte Fehlinterpretationen der Proteinexpressionsergebnisse vorgebeugt werden. Zur Erfassung toxischer Effekte wurde die Vitalfärbung mit Kresylviolett nach Nissl angewandt. Die Zellzahl vitaler Nissl-positiver Zellen wurde nach drei verschiedenen Expositionszeiten (4h, 24h und 48h) bei drei verschiedenen Statinkonzentrationen (10^{-5}M , 10^{-6}M und 10^{-7}M) durch manuelle Zählung bestimmt. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Versuchsreihen mit jeweils zwei sukzessiven Experimenten (Exp.1 und Exp.2) sind in den Abb. 11 und 12 dargestellt. Es wurden jeweils 10.000 bzw. 20.000 Zellen pro Well eines 8-Kammer-Objektträgers eingesät und unter permissiven (Abb. 11A und 12A) und nicht-permissiven (Abb. 11B und 12B) Inkubationsbedingungen kultiviert. Erwartungsgemäß nahm die Zellzahl unter (permissiven) Proliferationsbedingungen im Zeitverlauf zu (Abb. 11A und 12A), während sie unter (nicht-permissiven) Differenzierungsbedingungen stabil blieb oder leicht abnahm (Abb. 11B und 12B). Trotz zahlreicher, z. T. signifikanter Abweichungen der Zellzahlen in den Atorvastatin-behandelten Kulturen konnte unter den getesteten Bedingungen kein eindeutiger, reproduzierbarer toxischer Atorvastatineffekt nachgewiesen werden. Es kam teilweise sogar zu signifikanten Zellzahlerhöhungen unter Atorvastatineinfluss. Die stärkste Suppression der Zellzahl wurde in einem Experiment mit 10^{-5}M Atorvastatin nach 48h unter Differenzierungsbedingungen gefunden (Abb. 12B, Exp. 2), was darauf schließen ließ, dass nach Langzeitinkubation mit höchster Atorvastatinkonzentration toxische Effekte auftreten können. Allerdings war auch dieses Ergebnis in den Wiederholungsexperimenten (Abb. 11B und 12B, Exp. 1) nicht reproduzierbar. Daher ist davon auszugehen, dass die nachfolgenden Proteinexpressionsergebnisse nicht wesentlich durch toxische Statineffekte beeinflusst wurden.

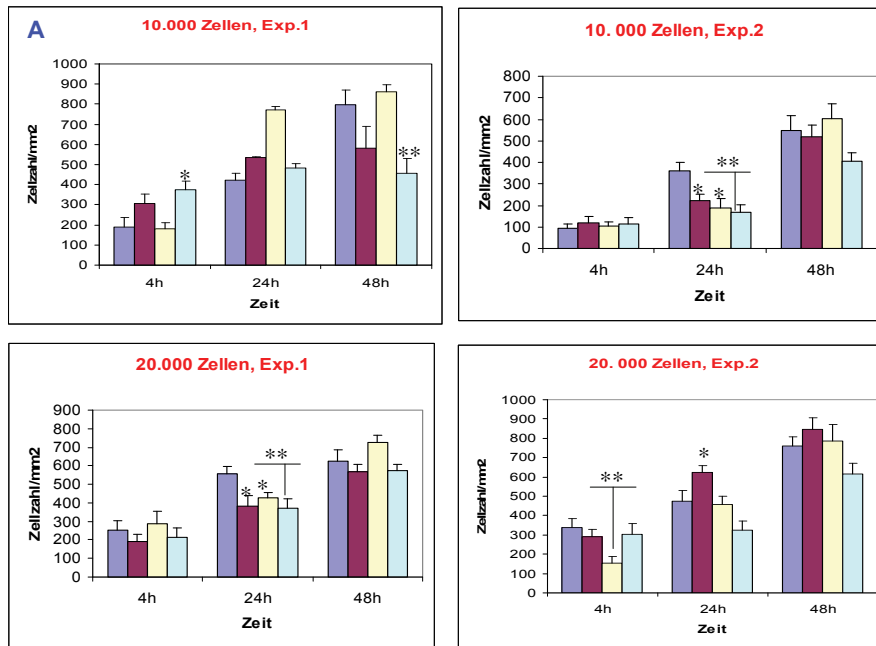


Abb. 11A Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zur Vitalitätsbestimmung von ST14A-Zellen mittels Nissl-Färbung nach 4 h, 24 h und 48 h Behandlung mit unterschiedlichen Atorvastatin-Konzentrationen ($10^{-7}M$ rotbraune Säulen, $10^{-6}M$ gelbe Säulen, $10^{-5}M$ türkisfarbene Säulen) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (blaue Säulen) unter permissiven Inkubationsbedingungen ($33^{\circ}C$) bei unterschiedlichen Zelldichten von 10.000 bzw. 20.000 Zellen pro Kammer auf 8-Kammer-Objektträgern. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und die Ergebnisse mit “Exp. 1“ und “Exp. 2“ gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 parallelen Bestimmungen. Die Atorvastatineffekte wurden mittels Student’s t-Test auf Signifikanz geprüft und die Irrtumswahrscheinlichkeiten folgendermaßen gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und * * $p < 0,01$.

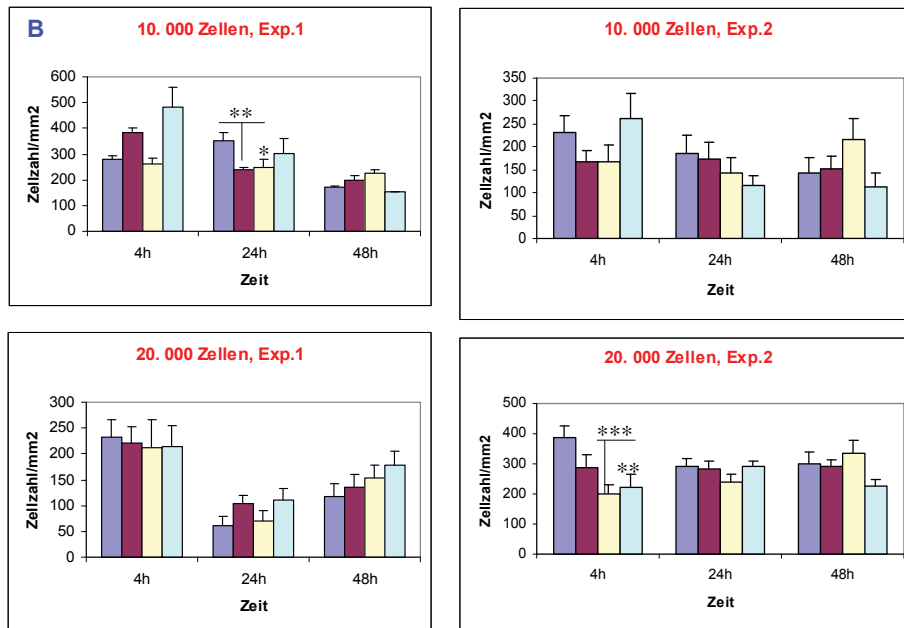


Abb. 11B Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zur Vitalitätsbestimmung von ST14A-Zellen mittels Nissl-Färbung nach 4 h, 24 h und 48 h Behandlung mit unterschiedlichen Atorvastatin-Konzentrationen (10^{-7} M rotbraune Säulen, 10^{-6} M gelbe Säulen, 10^{-5} M türkisfarbene Säulen) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (blaue Säulen) unter nicht-permissiven Inkubationsbedingungen (39°C) bei unterschiedlichen Zelldichten von 10.000 bzw. 20.000 Zellen pro Kammer auf 8-Kammer-Objektträgern. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und die Ergebnisse mit “Exp. 1“ und “Exp. 2“ gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 parallelen Bestimmungen. Die Atorvastatineffekte wurden mittels Student’s t-Test auf Signifikanz geprüft und die Irrtumswahrscheinlichkeiten folgendermaßen gekennzeichnet: * $p < 0,05$, * * $p < 0,01$ und * * * $p < 0,001$.

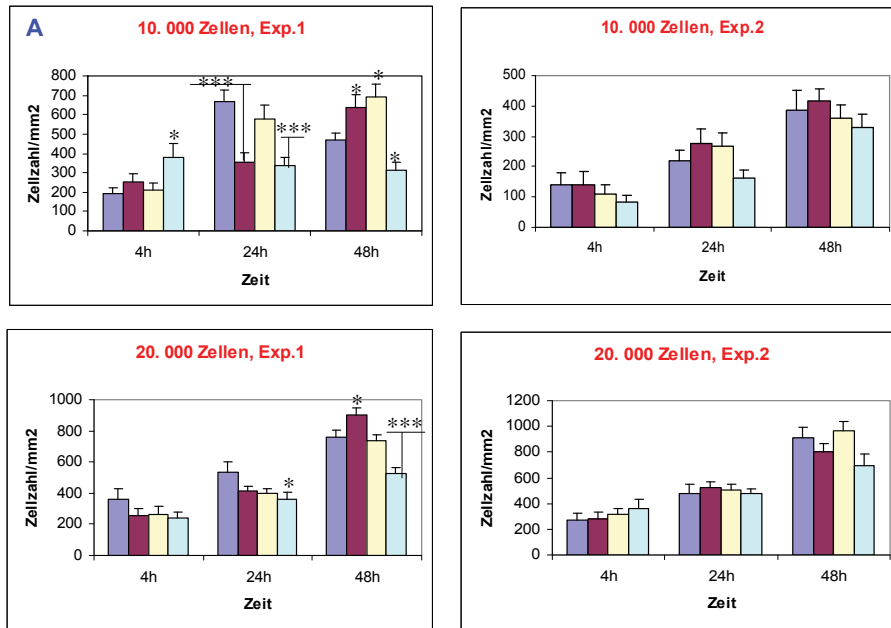


Abb. 12A Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe zur Vitalitätsbestimmung von ST14A-Zellen mittels Nissl-Färbung nach 4 h, 24 h und 48 h Behandlung mit unterschiedlichen Atorvastatin-Konzentrationen (10^{-7} M rotbraune Säulen, 10^{-6} M gelbe Säulen, 10^{-5} M türkisfarbene Säulen) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (blaue Säulen) unter permissiven Inkubationsbedingungen (33°C) bei unterschiedlichen Zelldichten von 10.000 bzw. 20.000 Zellen pro Kammer auf 8-Kammer-Objektträgern. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und die Ergebnisse mit “Exp. 1“ und “Exp. 2“ gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 parallelen Bestimmungen. Die Atorvastatineffekte wurden mittels Student’s t-Test auf Signifikanz geprüft und die Irrtumswahrscheinlichkeiten folgendermaßen gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und * * * $p < 0,001$.

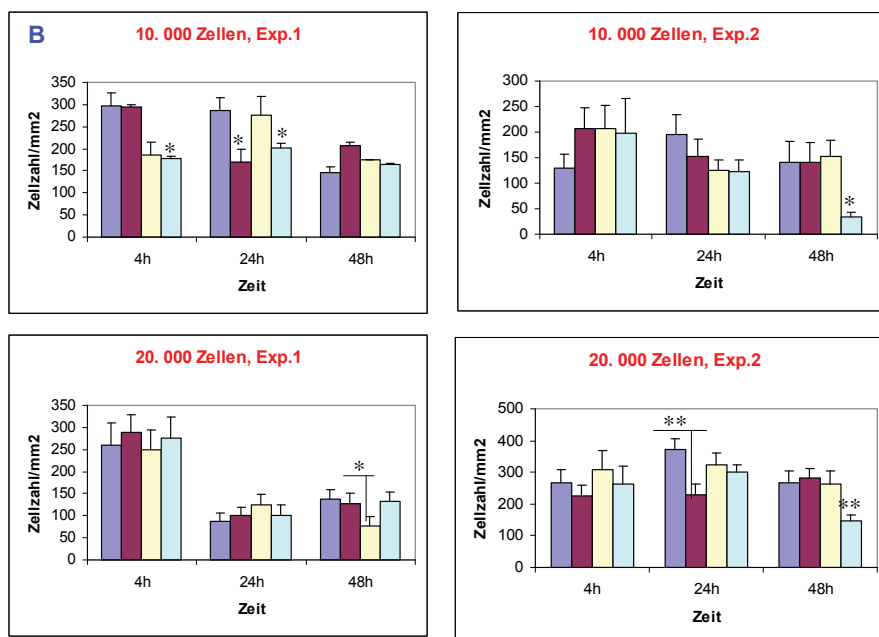


Abb. 12B Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe zur Vitalitätsbestimmung von ST14A-Zellen mittels Nissl-Färbung nach 4 h, 24 h und 48 h Behandlung mit unterschiedlichen Atorvastatin-Konzentrationen ($10^{-7}M$ rotbraune Säulen, $10^{-6}M$ gelbe Säulen, $10^{-5}M$ türkisfarbene Säulen) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (blaue Säulen) unter nicht-permissiven Inkubationsbedingungen ($39^{\circ}C$) bei unterschiedlichen Zelldichten von 10.000 bzw. 20.000 Zellen pro Kammer auf 8-Kammer-Objektträgern. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und die Ergebnisse mit “Exp. 1“ und “Exp. 2“ gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 parallelen Bestimmungen. Die Atorvastatineffekte wurden mittels Student’s t-Test auf Signifikanz geprüft und die Irrtumswahrscheinlichkeiten folgendermaßen gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

3.2.2. Basale Expressionskinetik Statin-sensitiver Proteine in ST14A-Zellen

Die Expression von 8 Kandidatenproteinen wurde mittels quantifizierbarem In-Zell-Western-Assay in 3-fach-Ansätzen unter den im vorangehenden Abschnitt 3.2.1. beschriebenen Bedingungen (ohne Atorvastatin bzw. mit $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ und $10^{-7}M$ Atorvastatin; 4h, 24h bzw. 48h Inkubationszeit, $33^{\circ}C$ bzw. $39^{\circ}C$ Inkubationstemperatur) bestimmt. Die Auswahl der Kandidatenproteine erfolgte auf der Basis der Ergebnisse der Gen- und Proteinexpressionsanalyse im EAE-Modell (ICAM-1, HSP105, TSP-1, PTX-3, SOCS-3, COX-1, siehe Abschnitt 3.1.) und auf Grund von Literaturhinweisen auf Statin-sensitive Proteine in ähnlichen Systemen (Ras und P-STAT-6). Die Messung der Signalstärke erfolgte

mit der Odyssey Software Version 1.2 unter Bezug auf β -Aktin und Korrektur des Untergrundes durch Subtraktion. Dabei wurden von allen drei Experimenten nur die Werte ohne Atorvastatin analysiert.

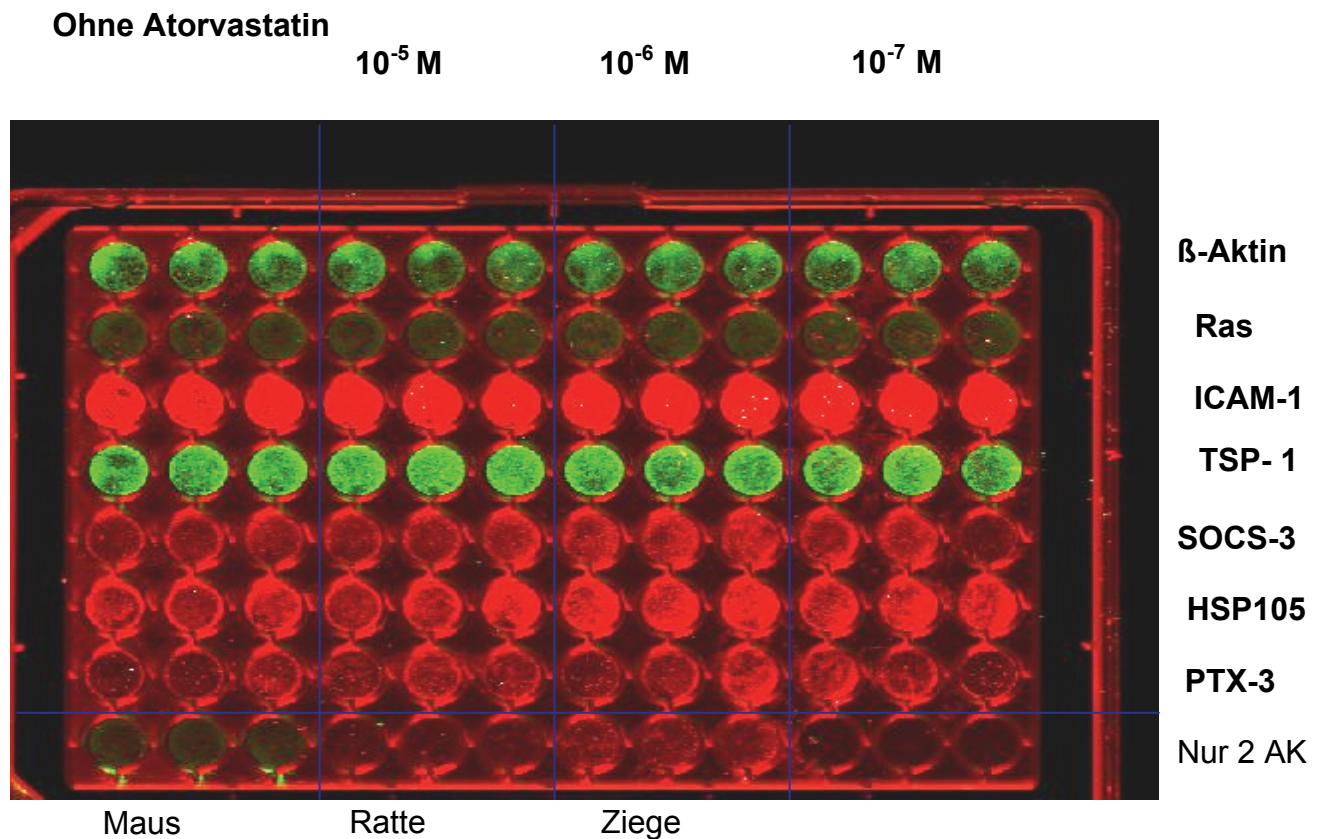


Abb. 13 Beispiel eines In-Zell-Western-Assays zur Bestimmung der Expression ausgewählter Kandidatenproteine und des Referenzproteins β -Aktin in proliferierenden ST14A-Zellen mit und ohne Atorvastatinexposition. Die Zellen wurden in der 96-Well-Flachboden-Platte für 4h bei 33°C mit den angegebenen Atorvastatinkonzentrationen (jeweils in 3 senkrechten Reihen zugegeben) inkubiert. Anschließend erfolgten die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen sowie die Detektion jeweils des am Rand genannten Proteins in der zugehörigen Zeile mit der Antikörper-Sandwich-Technik. Die Sekundärantikörper waren mit Fluorochromen gekoppelt, die im nahen Infrarotbereich emittierten. Zur besseren Darstellbarkeit wurden für die Auswertung Falschfarben benutzt (grün entspricht einer Emission bei 800 nm, rot bei 680 nm). Die letzte Zeile diente der Kontrollinkubation mit den 3 verwendeten Sekundärantikörpern ohne Primärantikörper. Die dort auftretenden Hintergrundsignale wurden von den Signalen der korrespondierenden Wells mit Primärantikörper abgezogen. Alle Bestimmungen erfolgten in 3-fach-Ansätzen, d. h. in 3 identisch behandelten

konsekutiven Wells. Die letzten 3 unten rechts befindlichen Wells wurden nur mit Zellen und Medium ohne Antikörper gefüllt. Deren Signale entsprachen der Autofluoreszenz.

Die Abb. 13 zeigt beispielhaft eine 96-Well-In-Zell-Western-Platte, in der die Zellen für 4h bei 33°C mit und ohne Atorvastatin inkubiert und nach Fixierung und Permeabilisierung hinsichtlich ihrer Expression der Kandidatenproteine Ras, ICAM-1, TSP-1, SOCS-3, HSP105, PTX-3 sowie des als Referenz dienenden Haushaltsproteins β -Aktin analysiert wurden. Die Originalbilder aller In-Zell-Western-Platten befinden sich im Anhang B der Arbeit. Die Proteinexpression spiegelt sich in der integrierten Fluoreszenzintensität des jeweiligen Wells, d.h. die integrierte Fluoreszenzintensität des Wells ist das Maß der Expression des untersuchten Proteins in den im Well befindlichen Zellen. In den nachfolgenden Abbildungen 14-17 ist die auf das Referenzprotein β -Aktin bezogene („normalisierte“) integrierte Fluoreszenzintensität der unbehandelten Zellen (basale Proteinexpression) als Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils 3 parallelen Wells angegeben. Die Ergebnisse der Atorvastatineinwirkung werden im nachfolgenden Abschnitt 3.2.3. beschrieben. In diesem Abschnitt soll zunächst die Kinetik der basalen Proteinexpression innerhalb des untersuchten Zeitraums dargestellt werden. Dazu sind in den Abb. 14-17 nur die Werte der Zellkulturen ohne Atorvastatinexposition aufgeführt.

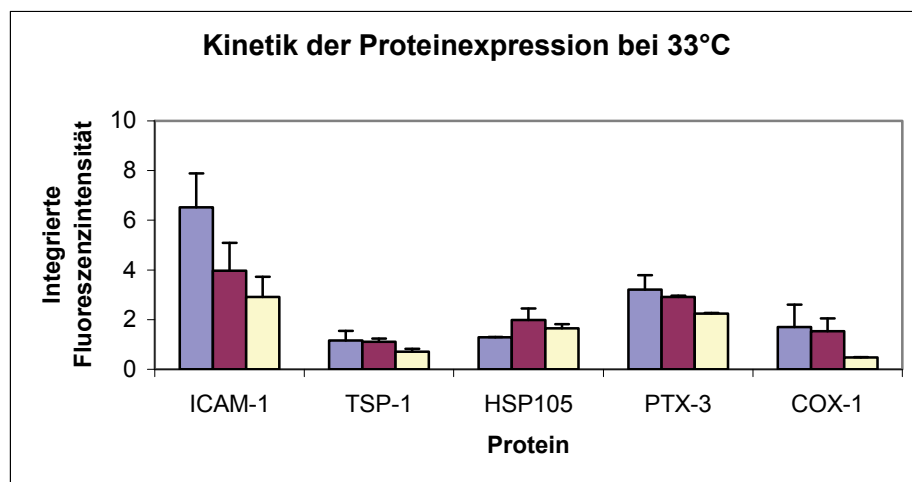


Abb. 14 Darstellung der basalen Expressionskinetik der Proteine ICAM-1, TSP-1 HSP105, PTX-3 und COX-1 in ST14A-Zellen nach 4 h (blaue Säulen), 24 h (rotbraune Säulen) und 48 h (gelbe Säulen) Inkubationszeit bei permissiver Temperatur von 33°C. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen.

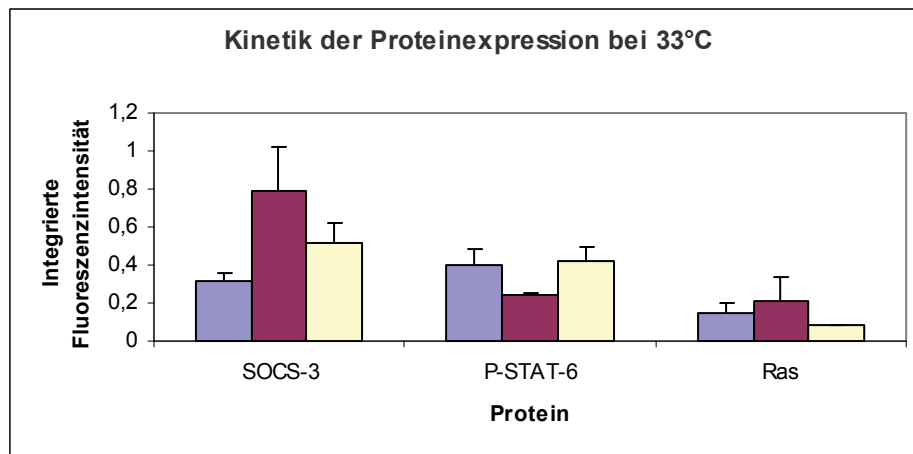


Abb. 15 Darstellung der basalen Expressionskinetik der Proteine SOCS-3, P-STAT-6 und Ras nach 4 h (blaue Säulen), 24 h (rotbraune Säulen) und 48 h (gelbe Säulen) Inkubationszeit bei permissiver Temperatur von 33°C. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen.

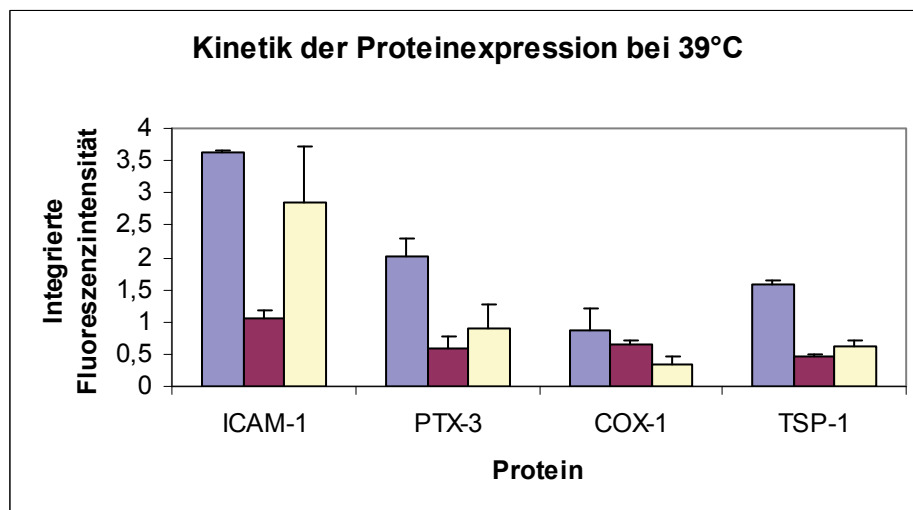


Abb. 16 Darstellung der basalen Expressionskinetik der Proteine ICAM-1, PTX-3, COX-1 und TSP-1 in ST14A-Zellen nach 4 h (blaue Säulen), 24 h (rotbraune Säulen) und 48 h (gelbe Säulen) Inkubationszeit bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen.

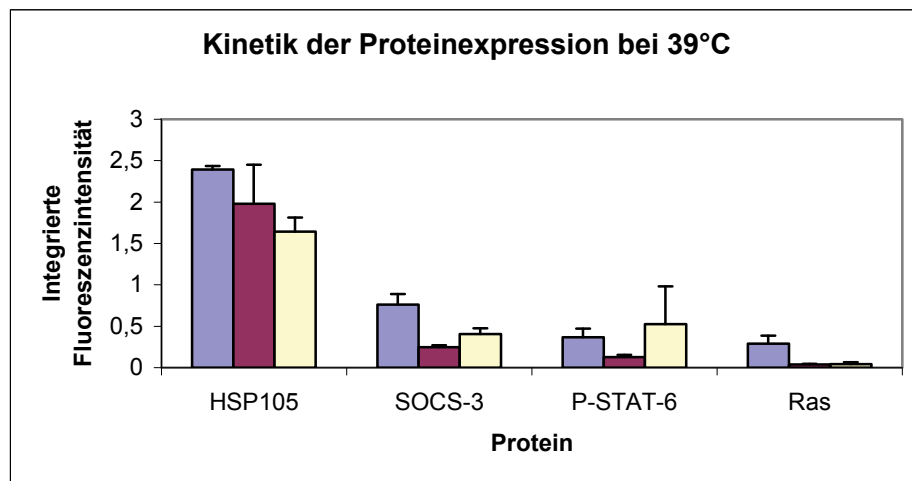


Abb. 17 Darstellung der basalen Expressionskinetik der Proteine HSP105, SOCS-3, P-STAT-6 und Ras in ST14A-Zellen nach 4 h (blaue Säulen), 24 h (rotbraune Säulen) und 48 h (gelbe Säulen) Inkubationszeit bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen.

Die Veränderungen sahen im Einzelnen wie folgt aus:

ICAM-1

Das ICAM-1 wurde bei 33°C nach 4 Std stark exprimiert, aber bei 24 Std sowie bei 48 Std. runterreguliert. Bei einer nicht-permissiven Temperatur von 39°C erfolgte nach 24 Std eine Runterregulierung des Proteins.

HSP105

Dieses Protein wurde ebenfalls mittelschwach exprimiert und nach 24 Std bei 33°C hochreguliert. Bei nicht-permissiver Temperatur von 39 °C wurde es nach 4 Std besonders stark hochreguliert.

TSP-1

TSP-1 wurde kontinuierlich mittelschwach exprimiert. Außerdem konnte festgestellt werden, dass das Protein nach 48 Std bei 33°C und nach 24 Std und nach 48 Std bei 39 °C runterreguliert wurde.

PTX-3

Dieses Protein wurde nach 48 Std bei permissiver Temperatur von 33°C leicht runterreguliert und nach 48 Std, besonders aber nach 24 Std bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C runterreguliert.

SOCS-3

Das SOCS-3 Protein wurde sehr schwach exprimiert und nach 24 Std bei permissiver Temperatur von 33°C, sowie nach 4 Std bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C hochreguliert.

COX-1

Das COX-1 wurde bei 33°C nach 48 Std deutlich runterreguliert und bei 39 °C nach 4 Std, 24 Std und nach 48 Std besonders deutlich runterreguliert.

Ras

Dieses Protein hat die niedrigsten Expressionswerte im Vergleich mit anderen Proteinen. Bei 33°C wurde es nach 48 Std, besonders deutlich aber bei 39° C nach 24 Std und 48 Std runterreguliert.

P-STAT-6

Das P-STAT-6 wurde allgemein schwach exprimiert. Nach 24 Std wurde es bei permissiver Temperatur von 33°C und nicht-permissiver Temperatur von 39°C runterreguliert.

Die wichtigsten Befunde der basalen Expressionskinetik lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Es lassen sich 3 Expressionsniveaus unterscheiden: Am stärksten wird das Protein ICAM-1 exprimiert, gefolgt von der Gruppe der Proteine TSP-1, HSP105, PTX-3 und COX-1. Das niedrigste Expressionsniveau wiesen die Proteine SOCS-3, P-STAT-6 und Ras auf.
- (2) Die unter (1) getroffene Aussage gilt sowohl für Proliferations- als auch für Differenzierungsbedingungen, zwischen denen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Proteinexpressionskinetik bestanden.

- (3) Die Kinetik der Proteinexpression folgte etwas vereinfacht dargestellt 3 verschiedenen Mustern: Es zeigte sich entweder ein stetiger Abfall über die Zeit, wie bei ICAM-1 und PTX-3 unter Proliferationsbedingungen und bei COX-1 unter Proliferations- und Differenzierungsbedingungen, oder ein transienter Abfall, wie bei P-STAT-6 unter Proliferationsbedingungen und bei ICAM-1, PTX-3, TSP-1, SOCS-3 und P-STAT-6 unter Differenzierungsbedingungen, oder ein transienter Anstieg, wie bei HSP105, SOCS-3 und Ras unter Proliferationsbedingungen und bei TSP-1, HSP105 und Ras unter Differenzierungsbedingungen.

Die beschriebenen basalen Expressionswerte bildeten die Grundlage für die Beurteilung der Effekte der Atorvastatinbehandlung auf die Expression der ausgewählten Kandidatenproteine, die im nächsten Abschnitt dargestellt werden.

3.2.3. Statineffekt auf die Proteinexpressionskinetik in ST14A-Zellen

Zur Untersuchung der *in vitro* Wirkung von Atorvastatin auf die Expression der 8 oben genannten Kandidatenproteine in ST14A-Zellen wurden drei unabhängige In-Zell-Western-Experimente bei der permissiven Temperatur von 33°C und der nicht-permissiven Temperatur von 39°C durchgeführt. Die Atorvastatinexposition erfolgte wie ebenfalls oben beschrieben über 3 verschiedene Zeiträume (4h, 24h und 48h) und bei 3 verschiedenen Atorvastatin-Konzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M).

Auf Grund der z.T. sehr heterogenen Ergebnisse ergaben sich häufig hohe Meßwertstreuungen, die den Nachweis signifikanter Expressionsänderungen ausschlossen. Die Auswertung berücksichtigte diese Tatsache und fokussierte deshalb auf Ergebnisse, die in mindestens 2 von 3 unabhängigen Experimenten einen signifikanten Atorvastatineffekt zeigten. Nur diese Ergebnisse werden in den folgenden Abbildungen 18-31 dargestellt und detailliert beschrieben. Dabei folgt die graphische Darstellung dem Prinzip, die Veränderungen der Proteinexpression durch Angabe der relativen Expression von behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen wiederzugeben, d.h. 100% entspricht jeweils der im vorangehenden Abschnitt 3.2.2. beschriebenen normalisierten integrierten Fluoreszenzintensität der korrespondierenden unbehandelten Zellen (siehe Abb. 14-17, basale Expressionskinetik). Sämtliche Originalergebnisse der auswertbaren Experimente, welche die Grundlage für die folgenden signifikanten Ergebnisse des Atorvastatineinflusses darstellen, sind im Anhang B der Arbeit aufgeführt. In einigen Fällen konnten einzelne In-Zell-Western-

Platten nicht zuverlässig ausgewertet werden, weil z. B. zu hohe Hintergrundfluoreszenzen auftraten oder die 3 parallelen Wells eine zu hohe Streuung aufwiesen. Diese Experimente fehlen daher in der Zusammenstellung des Anhangs.

Folgende signifikante Atorvastatineffekte wurden registriert:

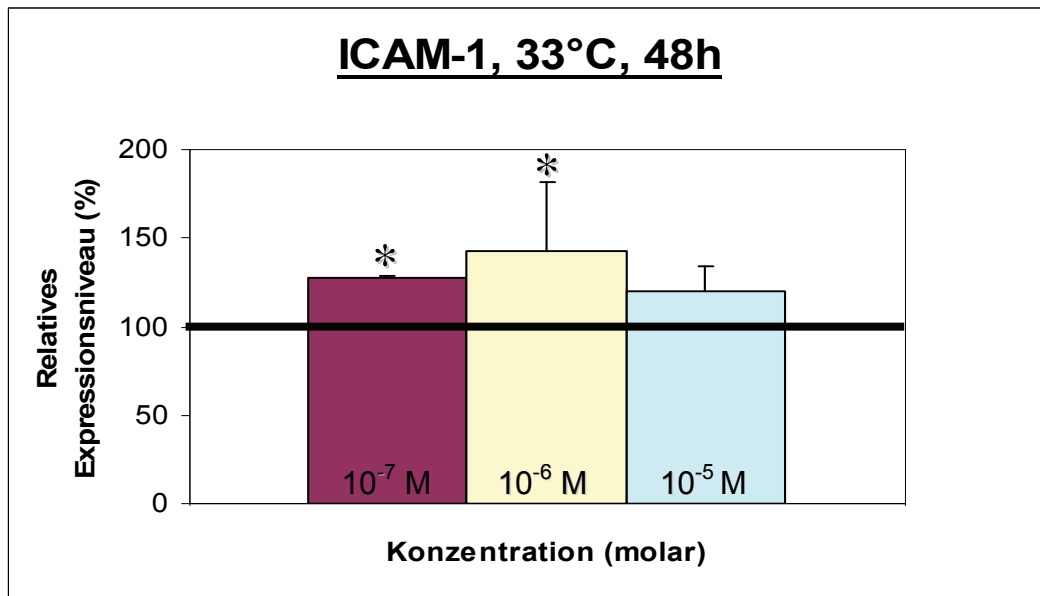


Abb. 18 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von ICAM-1 in ST14A-Zellen bei der permissiver Temperatur von 33°C und einer Statinexpositionszeit von 48 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$.

(1) ICAM-1 war nach 48h unter Proliferationsbedingungen (33°C) bei der niedrigen (10^{-7} M) und mittleren (10^{-6} M) Atorvastatinkonzentration um 30-40% heraufreguliert, während die höchste Statinkonzentration von 10^{-5} M keinen signifikanten Effekt ausübte (Abb. 18).

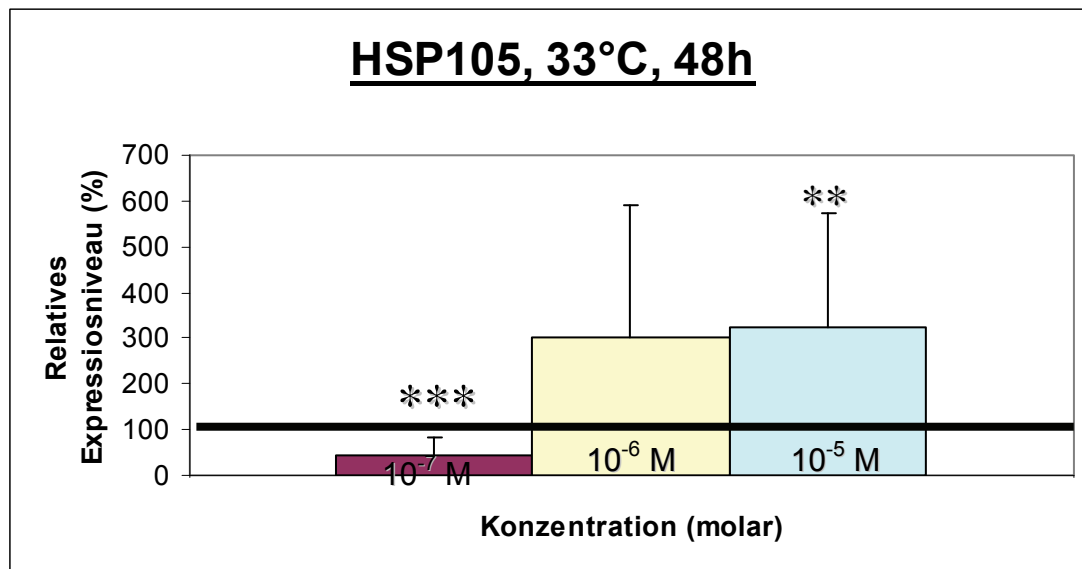


Abb. 19 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von HSP105 in ST14A-Zellen bei der permissiver Temperatur von 33°C und einer Statinexpositionszeit von 48 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * * $p < 0,01$ und * * * $p < 0,001$.

(2) Die HSP105-Expression war unter den gleichen Inkubationsbedingungen (48h, 33°C) bei der niedrigsten Atorvastatinkonzentration (10^{-7} M) um mehr als 50% reduziert und bei der höchsten Atorvastatinkonzentration um 200% gesteigert (Abb. 19).

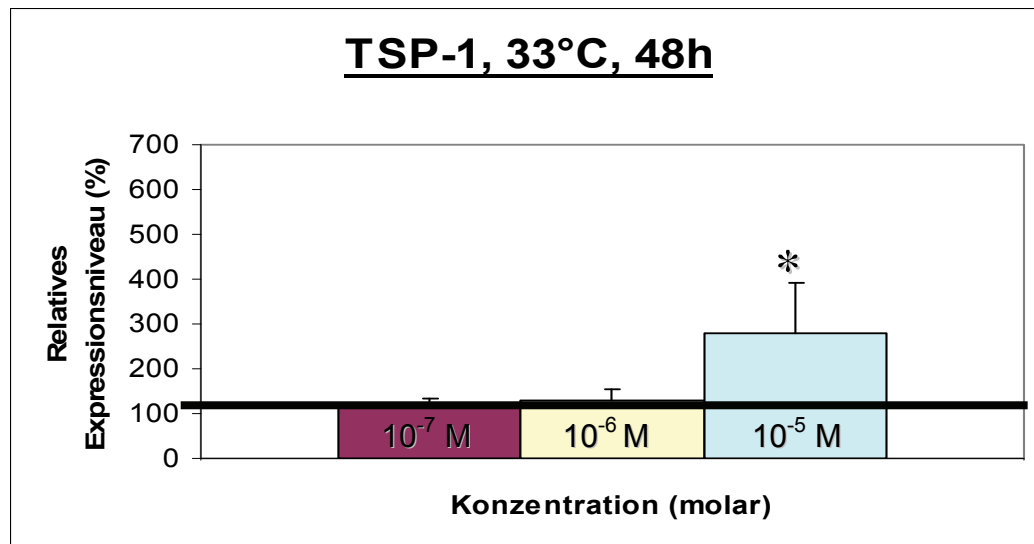


Abb. 20 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von TSP-1 in ST14A-Zellen bei der permissiver Temperatur von 33°C und einer Statinexpositionszeit von 48 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$.

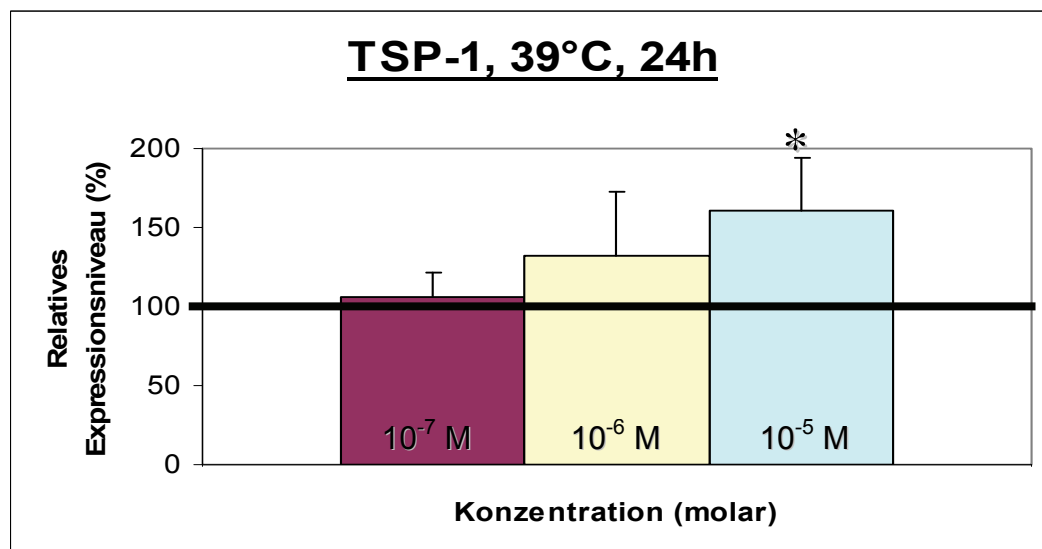


Abb. 21 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von TSP-1 in ST14A-Zellen bei der nicht-permissiver Temperatur von 39°C und einer Statinexpositionszeit von 24 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren

Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$.

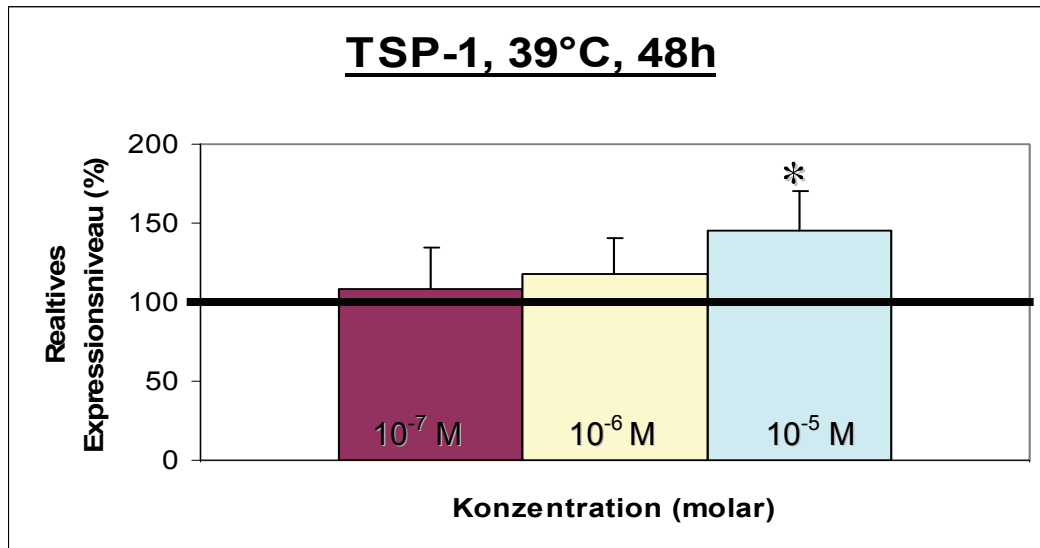


Abb. 22 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von TSP-1 in ST14A-Zellen bei der nicht-permissiver Temperatur von 39°C und einer Statinexpositionszeit von 48 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$.

(3) TSP-1 war bei der höchsten Atorvastatinkonzentration (10^{-5} M) nach 48h unter Proliferationsbedingungen um das 3-fache und nach 24h und 48h unter Differenzierungsbedingungen um das 1,5-fache heraufreguliert (Abb. 20-22).

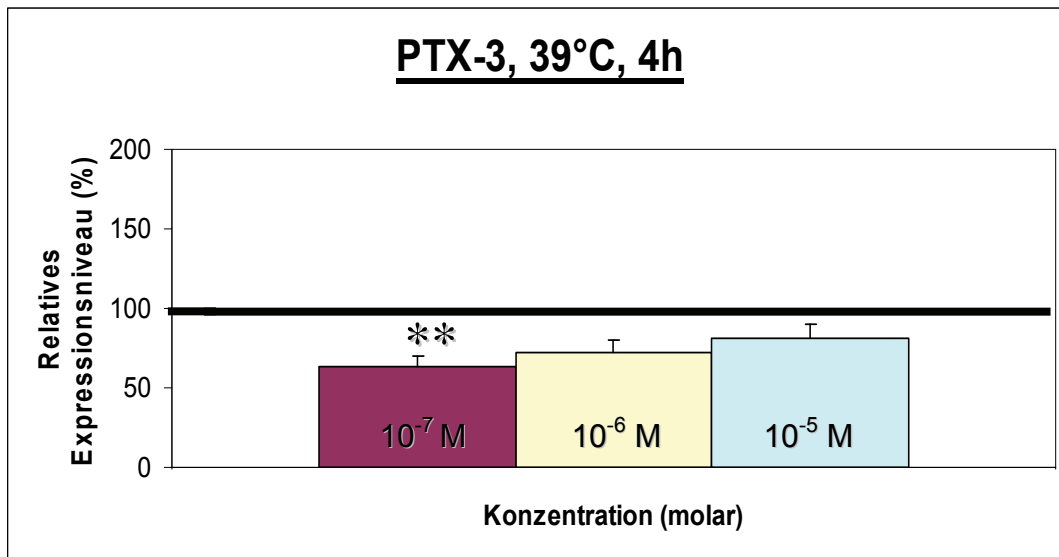


Abb. 23 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von PTX-3 in ST14A-Zellen bei der nicht-permissiver Temperatur von 39°C und einer Statinexpositionszeit von 4 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * * $p < 0,01$.

(4) Die PTX-3-Expression wurde durch die niedrigste Statinkonzentration (10^{-7} M) nach Kurzzeitinkubation (4h) unter Differenzierungsbedingungen um 40% reduziert (Abb. 23). Bei den höheren Statinkonzentrationen zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zur Suppression, die aber nicht signifikant war.

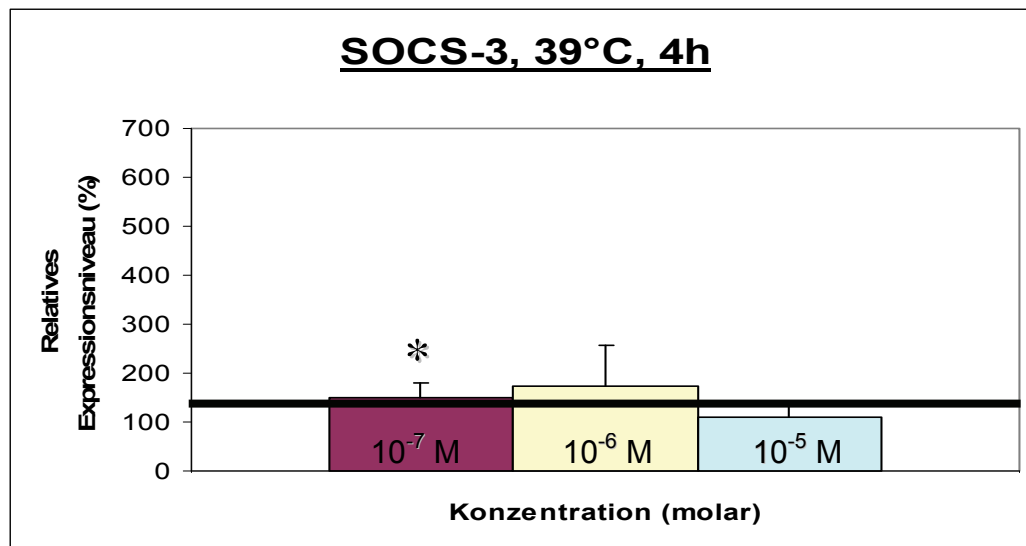


Abb. 24 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von SOCS-3 in ST14A-Zellen bei der nicht-permissiver Temperatur von 39°C und einer Statinexpositionszeit von 4 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$.

(5) Die SOCS-3-Expression wurde unter den gleichen Bedingungen (4h, 39°C) durch die niedrigste Atorvastatinkonzentration (10^{-7} M) um 40% gesteigert, während die höheren Statinkonzentrationen keinen signifikanten Einfluß ausübten (Abb. 24).

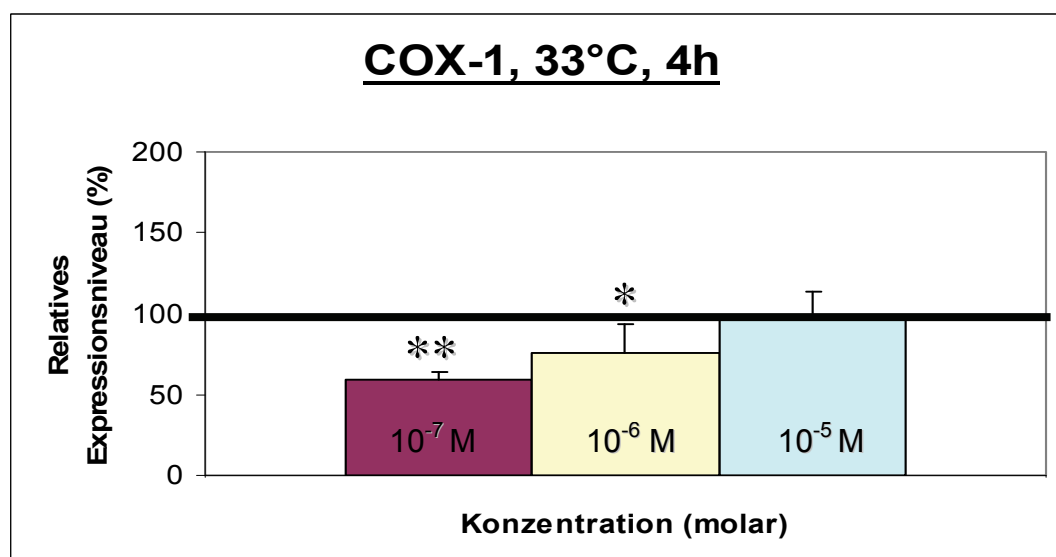


Abb. 25 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von COX-1 in ST14A-Zellen bei der permissiver Temperatur von 33°C und einer Statinexpositionszeit von 4 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und * * $p < 0,01$.

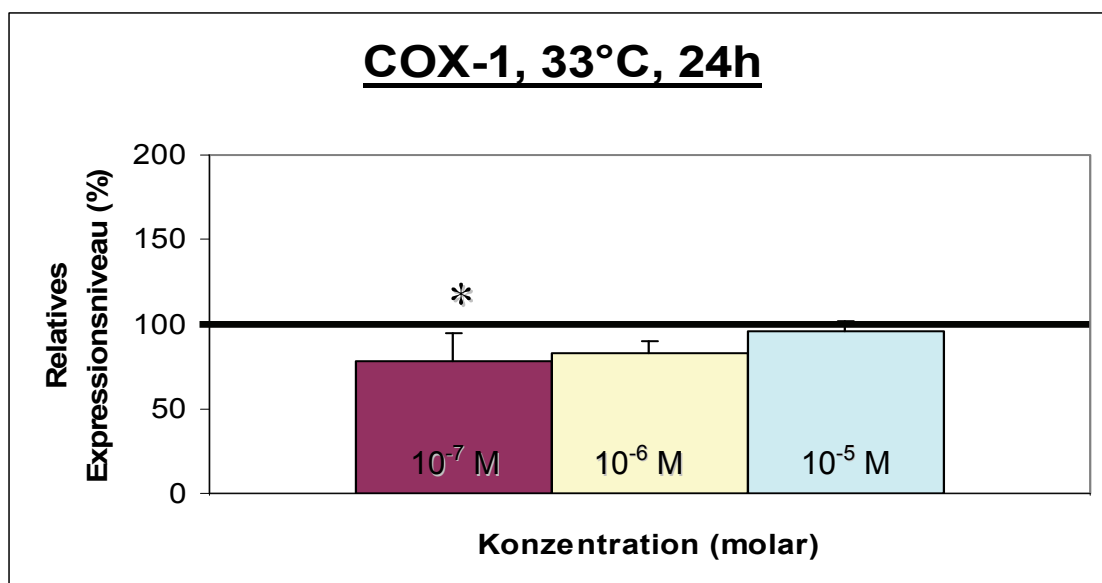


Abb. 26 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von COX-1 in ST14A-Zellen bei der permissiver Temperatur von 33°C und einer Statinexpositionszeit von 24 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$.

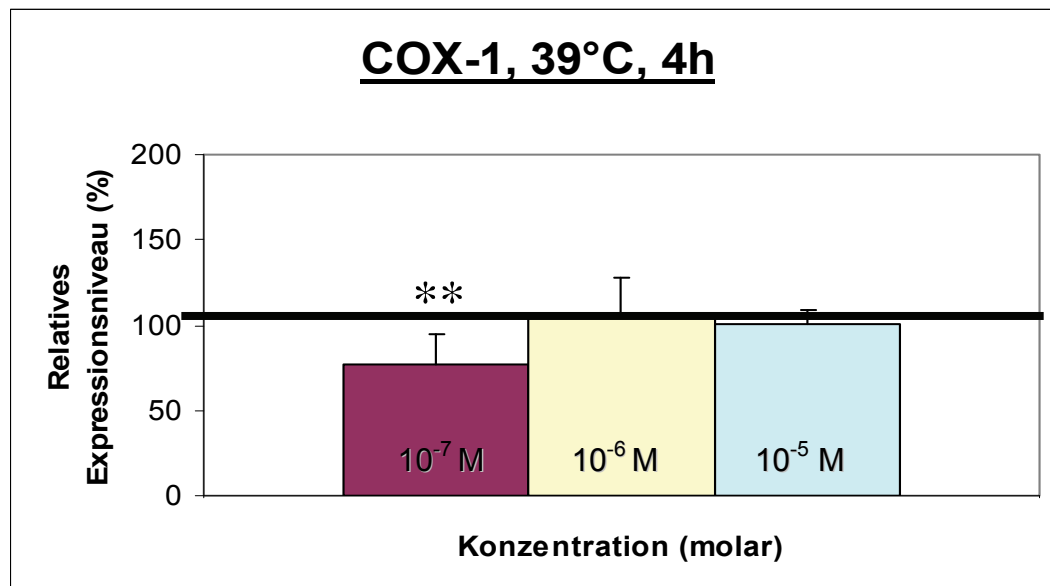


Abb. 27 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von COX-1 in ST14A-Zellen bei der nicht-permissiver Temperatur von 39°C und einer Statinexpositionszeit von 4 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * * $p < 0,01$.

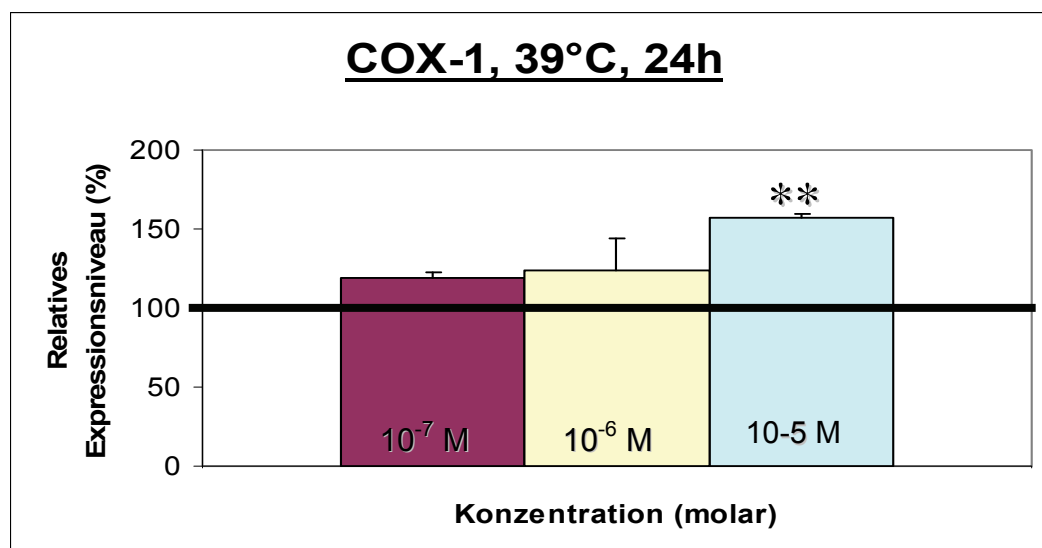


Abb. 28 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von COX-1 in ST14A-Zellen bei der nicht-permissiver Temperatur von 39°C und einer Statinexpositionszeit von 24 h mit den

Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * * $p < 0,01$.

(6) COX-1 war unter Proliferationsbedingungen nach 4h Atorvastatinexposition bei der niedrigsten Konzentration (10^{-7} M) um ca. 40% und bei der mittleren Konzentration (10^{-6} M) um ca. 20% herunterreguliert (Abb. 25). Nach 24h bewirkte unter den gleichen Bedingungen nur die niedrigste Statinkonzentration (10^{-7} M) eine ca. 20%-ige Herunterregulierung (Abb. 26). Unter Differenzierungsbedingungen war die COX-1-Expression nach 4h bei der niedrigsten Statinkonzentration (10^{-7} M) um ca. 20% herabgesetzt (Abb. 27), aber im Gegensatz dazu nach 24h bei der höchsten Statinkonzentration (10^{-5} M) um ca. 50% heraufreguliert (Abb. 28).

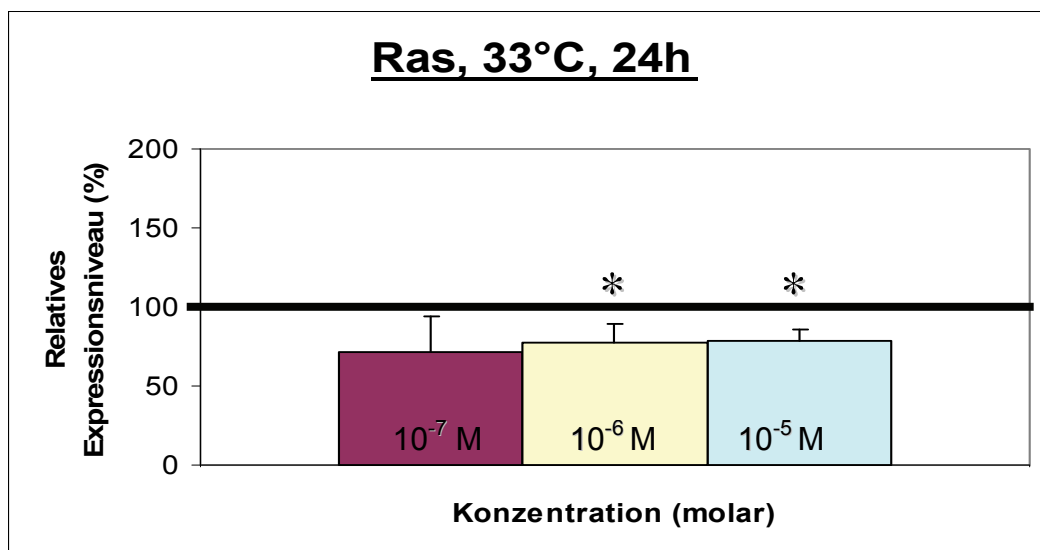


Abb. 29 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von Ras in ST14A-Zellen bei der permissiver Temperatur von 33°C und einer Statinexpositionszeit von 24 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen

Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$.

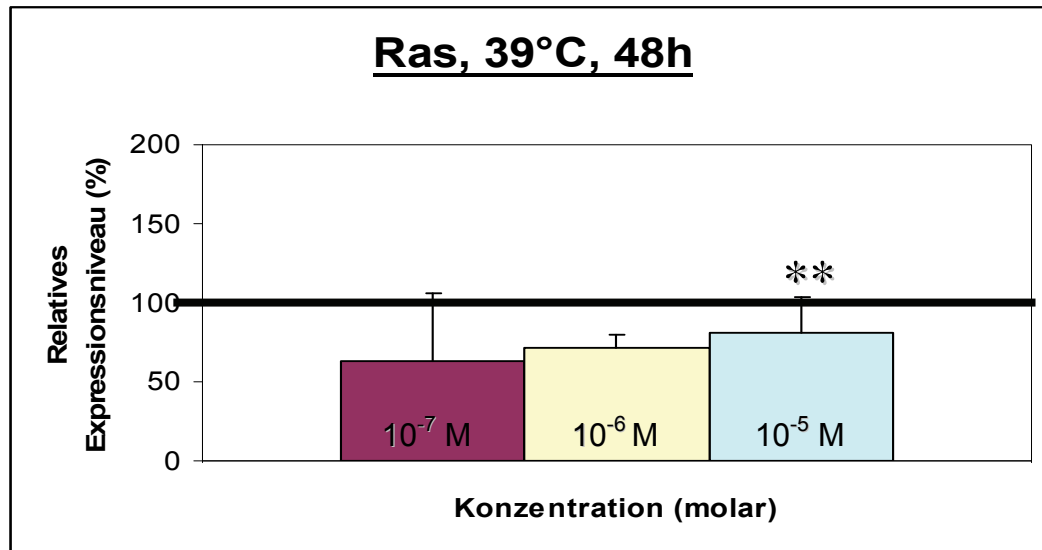


Abb. 30 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von Ras in ST14A-Zellen bei der nicht-permissiven Temperatur von 39°C und einer Statinexpositionszeit von 48 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * * $p < 0,01$.

(7) Ras wurde unter Proliferationsbedingungen nach 24h und unter Differenzierungsbedingungen nach 48h Atorvastatinexposition herunterreguliert. Im ersten Fall war die Ras-Expression bei den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-5} M um ca. 20% reduziert, im zweiten Fall nur bei 10^{-5} M (Abb. 29 und Abb. 30). Die Veränderungen unter niedrigeren Statinkonzentrationen waren, obwohl stärker im Ausmaß, nicht signifikant.

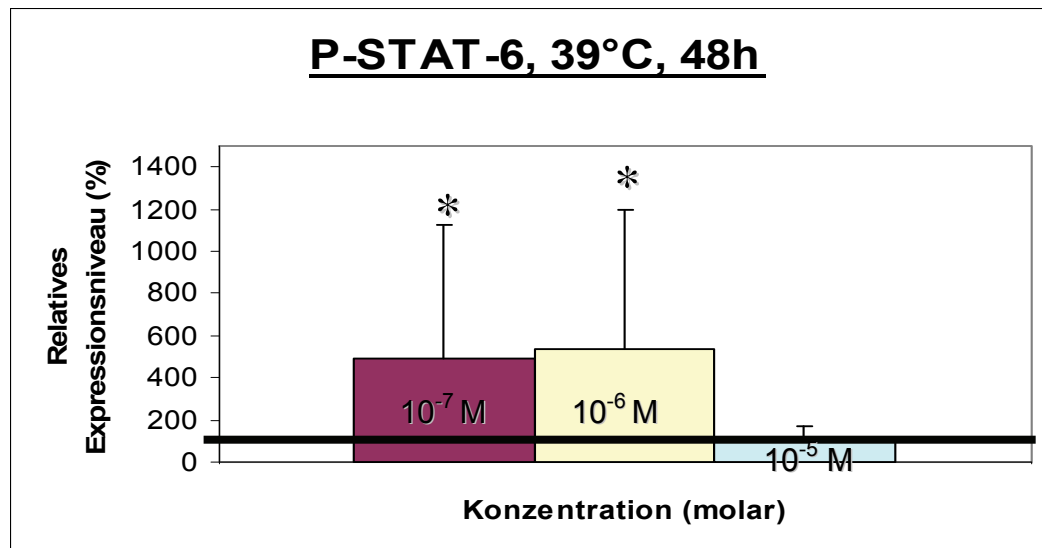


Abb. 31 Darstellung des relativen Expressionsniveaus von P-STAT-6 in ST14A-Zellen bei der nicht-permissiver Temperatur von 39°C und einer Statinexpositionszeit von 48 h mit den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säule), 10^{-6} M (gelbe Säule), 10^{-5} M (türkisfarbene Säule) bezogen auf unbehandelte Zellen (Inkubation ohne Atorvastatin), deren Expression (normalisierte integrierte Fluoreszenzintensität) auf 100% gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachansätzen. Signifikante Änderungen wurden mittels Student's t-Test ermittelt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$.

(8) P-STAT-6 wurde unter Differenzierungsbedingungen nach 48h bei den Atorvastatinkonzentrationen 10^{-7} M und 10^{-6} M um mehr als 400% hochreguliert. Allerdings waren die Meßwertstreuungen mit standardabweichungen $>700\%$ extrem hoch (Abb. 31).

Komprimiert können die wichtigsten Statineinflüsse auf die Expression der untersuchten 8 Kandidatenproteine wie folgt zusammengefasst werden:

- (1) Es wurden sowohl expressionssteigernde als auch expressions-supprimierende Effekte registriert, die mit 2 Ausnahmen strikt proteinspezifisch ausfielen, d.h. ICAM-1, TSP-1, SOCS-3 und P-STAT-6 wurden nur hochreguliert und PTX-3 und Ras nur herunterreguliert, während HSP105 und COX-1 je nach Inkubationsbedingungen herauf- oder herunterreguliert wurden.
- (2) Die Dauer der Statineinwirkung spielte ebenfalls eine proteinbezogen unterschiedliche Rolle. Während ICAM-1, HSP105 und P-STAT-6 ausschließlich auf Langzeitexposition (48h) reagierten, trat der Statineffekt bei PTX-3 und SOCS-3 nur

nach Kurzeitexposition (4h) und beschränkte sich bei COX-1 auf die Expositionszeiten 4h und 24h sowie bei TSP-1 und Ras auf 24h und 48h.

- (3) Auch die Konzentrationsabhängigkeit der Statinwirkung war relativ proteinspezifisch. TSP-1 wurde nur von der höchsten (10^{-5}M), PTX-3 und SOCS-3 nur von der niedrigsten Atorvastatinkonzentration (10^{-7}M) beeinflusst, während Ras auf 10^{-5}M und 10^{-6}M , ICAM-1 und P-STAT-6 auf 10^{-6}M und 10^{-7}M , HSP-105 auf 10^{-5}M und 10^{-7}M und COX-1 auf alle drei Konzentrationen reagierten.
- (4) Die Proteinabhängigkeit war noch deutlicher bei den Inkubationsbedingungen, unter denen die Statineffekte auftraten. ICAM-1 und HSP105 wurden nur unter Proliferationsbedingungen beeinflusst, PTX-3, SOCS-3 und P-STAT-6 nur unter Differenzierungsbedingungen und TSP-1, COX-1 und Ras sowohl unter Proliferations- als auch unter Differenzierungsbedingungen.

4. Diskussion

4.1. Diskussion des Tiermodells der EAE und seiner Beeinflussung durch Statine

Bedeutsame interzelluläre Signalwege sowohl in Immunzellen und als auch in Nervenzellen und ihren Vorläufern werden durch die Lipidmodifikation ihrer Komponenten beeinflusst (Sarkar et al. 2000; Lange et al. 2006; Chen et al. 2008). Das trifft insbesondere für die Rezeptor-aktivierte Signalvermittlung durch kleine GTPasen der Ras-Superfamilie zu. Die Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) werden dabei mit Ras bzw. RhoA verknüpft (Prenylierung) und aktivieren so den Ras/Raf/MEK/ERK- bzw. den Rho/ROCK-Signalweg (Waiczies et al. 2008). Letzterer kann z.B. über die Aktivierung von KAK/PI3K/AKT/ GSK3 β / β -Catenin die Zellproliferation fördern, aber auch über Interaktion mit dem Aktinzytoskelett die Zellmotilität steigern (Denoyelle et al. 2003; Waiczies et al. 2007). Der Geschwindigkeits-begrenzende Reaktionsabschnitt der Prenylierung ist die Konversion von HMG-CoA zu L-Mevalonat, die durch das Enzym HMGCR katalysiert wird. HMGCR-Inhibitoren vom Statintyp, deren Prototypsubstanz Atorvastatin darstellt, können daher potentiell sowohl Funktionen von Immunzellen als auch von Glia- und Nervenzellen beeinflussen, was insbesondere für die Interaktion dieser Zellen bei entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems von Interesse ist. Im Tiermodell der EAE konnte gezeigt werden, dass Atorvastatin die Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen über einer anhaltende Phosphorylierung von ERK1 vermittelt (Waiczies et al. 2005). Darüber hinaus kann die Hemmung der Geranylgeranylierung von RhoA die Migration dieser Zellen in das ZNS sowie innerhalb des ZNS behindern (Waiczies et al. 2007).

Welche Auswirkungen diese Signalinterventionen auf Glia- und Nervenzellen und ihre Vorläuferzellen haben, ist jedoch weiterhin unbekannt.

Obwohl Untersuchungen aus der Gruppe um Singh (Pahan et al. 1997) bereits vor über 10 Jahren erste Hinweise auf die Unterdrückung von NO und Zytokinen lieferten, blieben systematische Analysen von Statinwirkungen auf neurale Zellen im Vergleich zu Immunzellen aus. Es war daher Aufgabe der vorliegenden Arbeit in einem hypothesefreien Ansatz den Effekt von Atorvastatin auf Gen- und Proteinexpression in den beiden hauptsächlich von der EAE betroffenen Organkompartimenten, peripheres Immunsystem und ZNS, zu untersuchen. Darüber hinaus sollten diese Effekte während der Proliferation und Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen analysiert werden, um synergistische oder antagonistische Wirkungen für die angestrebte Regeneration des Nervengewebes bei neuroinflammatorischen Erkrankungen zu erfassen. Der Fokus war die Identifizierung von

Kandidatengenenen bzw. -proteinen, deren Veränderung unter Statineinwirkung einen prediktiven Wert für den therapeutischen Statineffekt bei der EAE und möglicherweise auch bei der MS haben könnte. Atorvastatin wurde gewählt, weil es das in der Klinik am häufigsten verwendete Statin-Präparat ist (Bernini et al. 2001; Staffa et al. 2002) und als stärkstes Statin auf dem deutschen Markt gilt: 10 mg Atorvastatin entsprechen in der Wirkung etwa 20-30 mg Simvastatin (Ishikawa et al. 2006). Das Präparat ist allgemein gut verträglich und mit nur minimalen Nebenwirkungen ($< 3\%$), meist leichte gastrointestinale Symptome, belastet (Bernini et al. 2001). Atorvastatin und andere Statine hatten in Studien der vergangenen Jahre die EAE günstig beeinflussen können (Stanislaus et al. 1999, 2001; Youssef et al. 2002; Aktas et al. 2003; Paintlia et al. 2004; Singh et al. 2004).

Eine Behandlung mit Lovastatin reduzierte die mononukleären Zellinfiltrationen im ZNS bei der EAE (Stanislaus et al. 1999, 2002). Eine andere Arbeitsgruppe (Paintlia et al. 2004) hat nach Anwendung von Lovastatin bei einer akuten EAE mittels Affymetrix-Mikroarray-Methode einen globalen Effekt auf immunsensitive Gene im Rückenmark festgestellt. Von Youssef et al. (2002) und Aktas et al. (2003) wurde als Prototyp-Statin Atorvastatin ausgewählt.

Youssef et al. (2002) haben die immunomodulatorische Wirkung von Atorvastatin bei der chronischen und rezidivierenden EAE untersucht. Aus ihren positiven Ergebnissen einer EAE-Suppression schlußfolgern die Autoren, dass Atorvastatin mit seinen pleiotropen Wirkungen sowohl bei der MS als auch bei anderen TH1-assoziierten Erkrankungen therapeutisch wertvoll sein kann. Aktas und Mitarbeiter (2003) fanden, dass sowohl subkutane als auch orale Verabreichungen von Atorvastatin die Aktivität der chronischen EAE bei SJL/J Mäusen inhibiert und die Entzündungsinfiltration ins ZNS mindert.

Im Vergleich mit Untersuchungen zu den erwähnten Arbeitsgruppen (Youssef et al. 2002; Aktas et al. 2003) ergaben sich in unserer Studie folgende Unterschiede:

1. Der klinische Verlauf war wesentlich milder und glich der schubförmigen remittierenden Form der MS. Zur Angleichung unserer Studie an die klinische Situation haben wir das Tiermodell der PLP-139-151 induzierten EAE gewählt und damit einen ähnlich milden Verlauf wie in der Klinik erreicht, denn mehr als 80% der MS-Patienten entwickeln eine rezidivierende remittierende Form der MS mit zunächst milden diskreten Symptomen.

2. Für unsere Studie haben wir männliche SJL Mäuse aus der Zucht von Charles River Wiga (Sulzfeld, Deutschland) benutzt, um einen typischen Krankheitsverlauf ohne Einfluss des weiblichen Hormonzyklus zu imitieren.
3. Es wurden Zellen aus drainierenden Lymphknoten, jedoch keine T-Zelllinien untersucht, um Zelllinienartefakte zu vermeiden.
4. Die basale und stimulierte Proliferation in den Lymphozyten der gesunden Tiere war höher als in den anderen Studien.

Wegen des milden EAE-Verlaufs in unserer Studie konnte der klinische Atorvastatineffekt nicht das Ausmaß annehmen, wie es in den zuvor publizierten Studien mitgeteilt wurde (Youssef et al. 2002; Aktas et al. 2003).

Oral verabreichte Statine wurden wie oben bereits erläutert in der Literatur als effektive Agentien bei der Prevention und Therapie der chronischen und rezidivierenden EAE beschrieben (Stanislaus et al. 2001; Youssef et al. 2002; Aktas et al. 2003). Bisher gibt es nur wenige Ergebnisse über die Statin-Behandlung von Patienten mit schubförmig remittierender MS (RR-MS). Die erste Pilot-Studie der Wirkung von oral verabreichtem Simvastatin bei Patienten mit RR-MS wurden in Lancet publiziert (Vollmer et al. 2004). In dieser Studie haben 30 Patienten mit schubförmig remittierenden MS oral 80 mg Simvastatin 4, 5 und 6 Monate bekommen. Die Behandlung wurde als gut tolerabel und mit Minderung der entzündlichen MS-Komponenten beschrieben. Vier Jahre später hat die Arbeitsgruppe Paul et al. (2008) Daten der Behandlung mit hohen Atorvastatin-Dosen bei Patienten mit RR-MS publiziert. Dabei haben 80 RR-MS Patienten 80 mg Atorvastatin in Kombination mit oder ohne Interferon- β über 3 und 9 Monate bekommen. Die Daten deuten darauf hin, dass die 9-Monate-Atorvastatin-Behandlung sicher ist und seine Wirkung unabhängig von einer Interferon- β Vorbehandlung entfaltet. Das Atorvastatin reduzierte die Läsionen, wie Ergebnisse von MRI-Messungen zeigten. Zukünftige Patienten-Studien müssen die Wirkung der immunmodulatorischen Effekte von Atorvastatin auf den klinischen Verlauf der RR-MS überprüfen.

In der vorliegenden Studie haben 7-Wochen alte Mäuse eine Dosis von 10 mg Atorvastatin/kg Körpergewicht erhalten. In der Klinik werden zur Behandlung einer Hypercholesterinämie bei Patienten mit einem Körpergewicht von 70 kg ca. 1,1 mg/kg Atorvastatin verabreicht, in

anderen EAE-Studien wurden 1 mg/kg (Youssef et al. 2002) bzw. 10 mg/kg eingesetzt (Aktas et al. 2003).

Unsere Untersuchungen im EAE-Modell wurden zu Beginn der ersten klinischen Symptome (Tag 10 n. i.), am Höhepunkt der Erkrankung (Tag 20 n. i.) und während der ersten Remission (Tag 30 n. i.) durchgeführt. Zur Simulation einer klinischen Situation erfolgte zwischen den Tagen 10 n. i. und 30 n. i. die Statinapplikation. Zur Kontrolle wurde gesunden, CFA-behandelten Tieren 10 bzw. 20 Tage lang Atorvastatin verabreicht.

Zunächst wurde die Wirkung des Statins auf die Expression von Genen untersucht, welche für die Pathogenese der EAE und vermutlich auch für die MS von Bedeutung ist. Zur Identifizierung der Statin-sensitiven Gene wurde in den Lymphknoten und im Rückenmark der beschriebenen EAE-Tiergruppen eine Microarrayanalyse der Genexpression durchgeführt. Dabei wurden 14 Gene identifiziert, deren Expression selektiv von Atorvastatin beeinflusst waren, wobei die Mehrheit mit Zelladhäsion, und -migration sowie Zytokinsignaling in Verbindung stand (TSP-1, Connexin-43, Galectin-3, Dectin-1, PTX-3, SOCS-3, CCL-11). Mit Blick auf den therapeutischen Effekt ist die Herunterregulation des Adhäsionsmolekül Connexin-43 und des proinflammatorischen Enzyms COX-1 in EAE-Lymphknoten plausibel. Für COX war bisher eine Statinbeeinflussung nur für die Isoform COX-2 bekannt (Deng et al. 2006; Habib et al. 2007). Die übrigen Gene einschließlich der B-Zellmarker CD20 und CD79, des Ca^{++} -bindenden Signalmoleküls S100, des Stressmoleküls HSP105 und des Hormons Inhibin-B1 waren allerdings zumindest in einer der beiden Phasen nach Atorvastatinbehandlung hochreguliert. Der therapeutische Effekt ist daher am ehesten damit zu erklären, dass Zellen bzw. Signalwege aktiviert wurden, die den Krankheitsprozess supprimieren und eventuell sogar reparative Prozesse stimulieren. Die Klärung dieser Frage erfordert zukünftige Detailanalysen in isolierten Zellkompartimenten bzw. -subpopulationen.

4.2. Diskussion der quantitativen Western-Blot-Methode

Zur Untersuchung von Veränderungen auf der Proteinebene wurde die quantitative Western-Blot-Methode mit im Infrarotbereich fluoreszierenden sekundären Antikörpern benutzt, die von LI-COR[®] Bioscience (Lincoln, Nebraska USA) entwickelt wurde. Zu dieser neuartigen Methode finden sich im Publikationsregister LI-COR[®] Bioscience bisher nur 13 Publikationen (z. B. Jenkins et al. 2008; Sankaranarayanan et al. 2008; Xun et al. 2008), die sich aber auf Untersuchungen beziehen, die mit unseren nicht vergleichbar sind. Die Methode ist hochsensitiv bei einem sehr schwachen Hintergrund im Vergleich zur Chemilumineszenz-Methode. Die Detektion ist ca. 200-400 mal effektiver als die der konventionellen Western-

Blot-Methode (Gingrich et al. 2000). Das Odyssey® Infrarot Fluoreszenz System übertrifft damit die älteren Lumineszenz-Methoden und führt mit der direkten Infrarot Fluoreszenz Detektion einen neuen Standard für die Western-Blot-Methode ein. Mit dieser Methode können deutlich reproduzierbare Bänder nachgewiesen werden. Zur besseren Darstellbarkeit wurden für die Auswertung Falschfarben verwendet (grün entspricht einer Emission bei 800 nm, rot bei 680 nm). Durch die Benutzung von zwei separaten Kanälen (700 und 800 nm) können zudem zwei verschiedene Targets gleichzeitig analysiert werden. Die Quantifizierung der Signal-Intensität erfolgte mit der Odyssey Software Version 1.2 unter Bezug auf das Haushaltsprotein β -Aktin (Normalisierung), um den Einfluss unterschiedlicher Proteinauftragsmengen zu eliminieren.

Für die Analyse der Proteinexpression wurden prototypisch das proinflammatorische Enzym COX-1 und das Stressmolekül HSP-105 ausgewählt. Um den Vergleich mit Literaturbefunden zu erweitern, wurden außerdem zwei bekannte Statin-unterdrückbare Moleküle in die Untersuchung einbezogen, die in der eigenen Genexpressionanalyse nicht signifikant verändert waren. Dabei handelt es sich um das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und das Lymphozytenaktivierungsmolekül CD86 (Youssef et al. 2002; Ledebøer et al. 2003; Yilmaz et al. 2006; Namazi 2007; Wu et al. 2008). In allen 4 Fällen ergaben die quantitativen Western-Blot- und immunhistochemischen Untersuchungen nur eine partielle Übereinstimmung mit der Genexpressionsanalyse bzw. den Literaturbefunden. Als Erklärung bieten sich mindestens drei Möglichkeiten an:

- 1) Die Detektionsschwelle ist zu hoch,
- 2) die Expressionskinetik ist unterschiedlich und
- 3) die posttranslationale Lipidmodifikation (Proteinprenylierung) von Signalproteinen, die die Proteinexpression, nicht aber die Genexpression regulieren, ist gehemmt.

4.3. Diskussion der Western-Blot-Ergebnisse im EAE-Modell

HSP105

In unseren Untersuchungen zeigte das HSP105 die stärksten Veränderungen sowohl im natürlichen EAE-Verlauf als auch unter Atorvastatineinfluß. Durch die EAE-Induktion wurde es in den Lymphknoten **hochreguliert** und im Rückenmark **herrunterreguliert** (Gruppen B-D). Die Atorvastatinbehandlung bewirkte in den Lymphknoten nach 10 Tagen eine zusätzliche transiente Hochregulation (G vs C), während der Effekt im Rückenmark marginal blieb. Auch bei den Kontrollmäusen steigerte die Atorvastatinbehandlung die HSP105-

Expression in den Lymphknoten erheblich (auf das 6-8-fache, Gruppe E-F). Im Rückenmark betrug die Steigerung nach 10 Tagen nur das ca. 3-fache (Gruppe E). Die stärkere HSP105 steigernde Atorvastatinwirkung in den Lymphknoten im Vergleich zum Rückenmark korrespondiert mit den Befunden der Genexpression. Allerdings erfolgte dort die Hochregulation in den EAE-Lymphknoten im Gegensatz zur Proteinexpression erst nach 20 Tagen Atorvastatinbehandlung (Gruppe H).

Vergleichbare Ergebnisse sind uns aus der Literatur nicht bekannt. Verschiedene Autoren beschreiben Effekte von Statinen bei anderen Mitgliedern der HSP-Familie. So berichten z.B. Ciocca et al. (2003) über einen massiven Zelltod nach der Behandlung von drei unterschiedlichen Tumortypen mit Doxorubicin und Lovastatin, wobei die Sarkome eine erhöhte HSP25-Expression aufweisen. Außerdem wurden Statin-Effekte in der Netzhaut untersucht. In der Retina modulieren sie die Expression von HSPs, wobei sie das Überleben der Ganglienzellen verbessern (Schmeer et al. 2008). Statine fördern zudem die Expression des HSP27 in der Rattenretina (Kretz et al. 2006). Die von uns gefundene Steigerung der HSP105-Expression durch Atorvastatin steht also in Übereinstimmung mit den meisten Literaturbefunden in anderen Systemen.

COX-1

Bezüglich der COX-1-Expression ergaben unsere Untersuchungen eine Suppression durch die Atorvastatinbehandlung im Rückenmark der EAE-Mäuse nach 10 Tagen (Gruppe G vs C) und bei den Kontrollmäusen nach 10 und 20 Tagen (Gruppen E-F). Die Beurteilung der frühen Atorvastatinwirkung in den EAE-Lymphknoten ist dadurch beeinträchtigt, dass die Vergleichswerte der EAE-Tiere ohne Statinbehandlung (Gruppe B und C) fehlen. Der Vergleich der Werte nach 20 Tagen Atorvastatinbehandlung (H vs D) spricht jedoch ebenfalls für eine leichte suppressorische Wirkung. Bei den Kontrollmäusen bewirkte die 20-tägige Atorvastatinbehandlung eine Steigerung der COX-1-Expression (Gruppe F). Eine Korrelation zur Genexpression, bei der eine Suppression in den EAE-Lymphknoten nach einer 10-tägigen Atorvastatinbehandlung gefunden wurde, muss wegen fehlender Werte der Gruppe C offen bleiben.

Vergleichbare Daten aus der Literatur liegen nicht vor.

Die COX erzeugen erhebliche Störungen bei Erkrankungen des Gehirns. Eine Überexpression von COX ist bei Entzündungen, Immunmodulation, Apoptose und Fieber zu beobachten. Deininger et al. (1999) haben die Lokalisation von COX-1 und COX-2 bei der EAE der Ratte bestimmt. Die Daten zeigen, dass die Expression von COX-1 in Makrophagen und Mikrogliazellen und die des COX-2 in Endothelzellen entscheidende regulatorische Mechanismen bei Entzündungsprozessen des Ratten-Gehirns auslöst.

Moon et al. (2005) berichten, dass Phenidone, das sind doppelte Inhibitoren der COX und Lipoxygenasen (LOX), Symptome der EAE der Ratte dämpfen.

Unsere überwiegend suppressorischen Statin-Wirkungen auf die COX-1-Expression im EAE-Modell lassen sich also sowohl mit Literaturbefunden als auch mit einem positiven therapeutischen Effekt auf die EAE in Einklang bringen.

ICAM-1

Die Expression von ICAM-1 bei EAE-Mäusen war in unseren Untersuchungen sowohl in den Lymphknoten als auch im Rückenmark im wesentlichen Atorvastatin-unabhängig. Lediglich die 10-Tage-Behandlung führte im Rückenmark zu einer **leichten Suppression** (G vs C). Auffällig war jedoch die etwa 8-fache **Hochregulation** in den Lymphknoten der Kontrollmäuse nach 20-tägiger Atorvastatinbehandlung (Gruppe F). Diese kontrastierte mit einer Herunterregulierung im Rückenmark der gleichen Tiergruppe.

Es gibt nur wenige Publikationen, die mit unseren Ergebnissen verglichen werden können. Aktas et al. (2003) fanden, dass Atorvastatin in der EAE die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und Lymphozyte Function-associated Antigen-1 (LFA-1) in Leukozyten und Endothelzellen herunterreguliert, was die Bindung von LFA-1 und ICAM vermindert (Aktas et al. 2003; Namazi 2004). Diese Bindung ist ein wichtiges Ziel für die Behandlung von Entzündungserkrankungen (Kallen et al. 1999; Weitz-Schmidt et al. 2001; Giguere and Tremblay 2004). Stanislaus et al. (2001) haben den Effekt von einem anderen Statin, dem Lovastatin, bei der EAE auf die Transmigration von mononukleären Zellen in das ZNS untersucht. Die Behandlung mit Lovastatin führte zu verminderter Transmigration von mononukleären Zellen ins ZNS, weil es die Expression von LFA-1, dem Liganden des ICAM-1, in den Endothelzellen herunterreguliert. Multipotente NPZ von neugeborenen Ratten wurden bei der EAE intraventrikulär transplantiert. Die implantierten Zellen migrierten in die entzündete weiße Substanz und differenzierten dort zu Gliazellen. Die NPZ-

Transplantation unterdrückte die klinischen Symptome der EAE und die Hirnentzündung, was mit einer Reduktion der perivaskulären Infiltrate und Verminderung die Expression von ICAM-1 und LFA-1 verbunden war (Einstein et al. 2003). Dieselbe Arbeitsgruppe (Einstein et al. 2006) berichtet drei Jahre später erneut über die intraventrikuläre Transplantation von NPZ bei der EAE. Wiederum migrierten die Zellen in die entzündete weiße Substanz und minderten die klinische Symptome der EAE. Die durch NPZ-Transplantation verminderte Entzündung im Gehirn war durch die Reduktion der perivaskulären Infiltrate und der Gesamtzahl der T-Zellen im Hirn sowie die erhöhte Zahl regulatorischer T-Zellen und die Reduktion der Expression von ICAM-1 und LFA-1 im Gehirn bedingt. Daten von Namazi (2007) zeigten zudem die Herunterregulation der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 auf neutrophilen Granulozyten bei dermatologischen Erkrankungen durch verschiedene Statine, was zur Inhibition der Granulozytenaktivität führte.

Des weiteren wurde die Wirkung von Statinen bei der Systemischen Sklerose (SSc) untersucht, die von allen rheumatischen Erkrankungen eine besonders hohe Mortalitätsrate besitzt. Nach einer Statin-Behandlung von sechs Monaten war der Level von ICAM-1, vWF, Fibrinogen und ESr im Blut signifikant erniedrigt und die Vasodilatation begünstigt (Abou-Raya et al. 2007).

Die überwiegend suppressorischen Statinwirkungen auf die ICAM-1-Expression in der Literatur erschweren eine Interpretation unserer Befunde, die kaum Effekte in der EAE und eine Hochregulation in gesunden Lymphknoten belegen. Eindeutige Schlussfolgerungen über den prediktiven Wert von ICAM-1 für Statinwirkungen in der EAE (und MS) lassen sich nicht ziehen, wofür auch die mangelnde Gen-Expressionsänderung im Mikroarray-Assay spricht.

CD86 (B7.2)

Das Immunzellaktivierungsmolekül CD86 war in unserer Studie im Verlauf der EAE in den Lymphknoten transient um das 3-fache **hochreguliert** (Gruppe C) und im Rückenmark im Zeitverlauf zunehmend **supprimiert** (Gruppen B-D). In den Lymphknoten der EAE-Mäuse trat ein zusätzlicher stimulierender Atorvastatineffekt auf (Gruppen G-H vs C-D). Dieser zeigte sich auch nach 20-tägiger Behandlungsdauer bei den Kontrollmäusen (Gruppe F). Im Gegensatz dazu konnte als einziger auffälliger Atorvastatineffekt im Rückenmark eine ca. 50%-ige Suppression nach 20-tägiger Behandlung bei den Kontrollmäusen festgestellt werden.

Die Wirkung des Atorvastatins auf das CD86 Protein wurde bei der EAE bisher nur von Youssef et al. (2002) beschrieben. Dort unterdrückte Atorvastatin die IFN- γ -induzierbare Expression von CD40, CD80 und CD86. Die Untersuchungen erfolgten in der chronischen und rezidivierenden EAE an weiblichen SJL/J Mäusen. Im Gegensatz dazu erfolgten unsere Untersuchungen an männlichen SJL Mäuse mit schubförmiger EAE. Yilmaz et al. (2004, 2006) beschrieben, dass Statine in dendritischen Zellen die Expression von reifungsverbundenen Markern, wie CD83, CD40 und CD86 signifikant reduzierten. Außerdem minderte Simvastatin die Expression von CD28 in Splenozyten und die Expression von CD80 und CD86 in Antigen-präsentierenden Zellen, was sich inhibitorisch auf den Tumor Nekrose-Faktor (TNF) auswirkte (Wu et al. 2008). Auch Kuipers et al. (2005) berichteten, dass Statine die Expression von immunregulatorischen Molekülen der Zelloberfläche, wie MHC Klasse I, CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, CD80, CD86 und CD54 reduzierten. Die Atorvastatin-Behandlung weiblicher NZB/WF Mäuse mit systemischem Lupus erythematosus führte zur Verminderung der Expression von MHC Klasse II bei Monozyten und B-Lymphozyten sowie zur Reduktion der Expression von CD80 und von CD86 bei B-Lymphozyten (Lawman et al. 2004). Das gleiche Statin inhibierte den CD86-Spiegel im Blut bei Patienten mit Angina pectoris (Li et al. 2004). Auch Sun and Fernandes (2003) stellten fest, dass Lovastatin die Reifung von dendritischen Zellen des Knochenmarks und die Expression von MHC Klasse II und CD40 inhibierten, wobei die inhibitorische Wirkung auf die Expression von CD80, CD86 und CD11b geringer war.

Von unseren Befunden lässt sich lediglich die CD86-Suppression nach Atorvastatin-Langzeitbehandlung in Lymphknoten und im Rückenmark mit den Literaturmitteilungen im Übereinstimmung bringen. Die Stimulation in Lymphknoten der EAE-Mäuse deutet auf einen von den Literaturmodellen abweichenden Mechanismus in unserem EAE-System hin.

4.4. Diskussion der In-Zell-Western-Ergebnisse an ST14A-Zellen

Typische Symptome der MS sind zyklische Myelin-, Axon- und Oligodendrozytenverluste. Stammzellen besitzen ein Potential für die Regeneration abgestorbener Gewebe bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen, einschließlich der MS (Gallo and Armstrong 2008). Die MS ist eine der vielen neurologischen Erkrankungen, die ein potentiell Target für die Stammzellentherapie bildet (Duncan et al. 2008; Lavdas et al. 2008). Die exogenen Stamm- und Vorläuferzellen werden in das Gehirn implantiert, wo sie Zellverluste ersetzen können (Goldman and Windrem 2006). Nach der Implantation ins ZNS zeigen die

Stammzellen Tendenzen, direkt in die Läsionen zu migrieren (Singec et al. 2007). In den letzten Jahren haben die Anwendung und der Nutzen von Stammzellen aus lokal-territorialen, ethischen und moralischen Gründen große internationale Debatten ausgelöst (Weissman 2002). Die neuronalen Stammzellen (NSZ) waren die ersten, in denen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung zu Neuronen sowie zu Oligodendrozyten oder Astrozyten im ZNS erkannt wurde. Die glialen Progenitorzellen (GPZ) können proliferieren, jedoch verfügen sie nur über beschränkte Eigenschaften zur Selbsterneuerung und Differenzierung in die verschiedenen Zelltypen (Hsu et al. 2007).

In der klinischen experimentellen Stammzellentherapie der MS gibt es derzeit zwei Formen: 1. Die Immunrekonstruktion durch hämopoetische Transplantation und 2. Die Geweberekonstruktion mittels Transplantation von mesenchymalen Stammzellen auf Grund ihrer transdifferenzierenden und reparativen Eigenschaften (Scolding 2006).

Durch Transplantation exogener Stamm- und Vorläuferzellen ins Gehirn sowie durch intravenöse Infusionen können die bei der MS entstandenen Zellverluste partiell ersetzt werden (Goldman and Windrem 2006). NSZ und NPZ vermögen auch verschiedene immunmodulatorische Faktoren zu bilden, welche die Entzündung reduzieren, sowie Wachstumsfaktoren, welche die transplantierten endogenen Vorläuferzellen zur Proliferation, Differenzierung und Migration in defekten Gehirnregionen anregen (Pluchino and Martino 2008).

Einstein and Ben-Hur (2008) fanden, dass transplantierte NSZ die Entzündung mindern, das ZNS vor Degeneration schützen und endogene Reparaturprozesse fördern können. Für Untersuchungen in der MS wurden unterschiedliche Typen neuraler Vorläuferzellen verwendet, z. B. pluripotente embryonale Zellen (ESZ), multipotente fötale Zellen, adulte Zellen aus dem Gehirn, Zellen des olfaktorischen Systems (OECs) und Perizyten aus Kapillaren des adulten ZNS (Duncan et al. 2008). Aus heutiger Sicht sollten die zukünftigen Forschungsprioritäten bei der therapeutischen Anwendung von Stamm- und Vorläuferzellen bei der MS u.a. folgende Kriterien erfüllen: 1. Bestimmung des spezifischen Stammzelltyps, der die Geweberegeneration optimiert, 2. Sicherstellung geeigneter Quellen von Stamm- und Vorläuferzellen in internationaler Kooperation, 3. Aufbau standardisierter Tiermodelle und 4. Verständnis der Rolle von Entzündungen bei der Geweberegeneration.

Letzteres ist besonders wichtig, weil die MS als autoimmune Erkrankung mit Entzündungen im ZNS einhergeht (Duncan et al. 2008). Da nicht in allen Tier-Modellen der MS Entzündungen auftreten, sind die Ergebnisse mit humanen Befunden nicht immer kompatibel.

Die Zelltransplantation bietet neue Möglichkeiten für die Behandlung der MS. Dazu ist es besonders wichtig, neue Strategien für die Remyelinisierung der Axone und der Oligodendrozyten aus exogenen Quellen zu finden (Duncan 2008).

Die aktuelle immunmodulatorische Therapie der MS kann eine Progression der Erkrankung hemmen, jedoch vorhandene Schädigungen oder Gewebsverluste nicht ersetzen. Wirkstoffe, die Zugang zum ZNS haben, können einen direkten Effekt auf die Stamm- und Verläuferzellen ausüben. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass Statine regulierend auf die Proliferation, Bildung von Ausläufern und weitere Differenzierung von NPZ Einfluss nehmen können (Duncan et al. 2008). Antel and Miron (2008) haben die Wirkungen von unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten auf neuronale Zellkulturen zusammengefasst. Die Agentien Interferon- β und Glatirameracetate haben keinen erkennbaren Zugangsweg ins ZNS. Das Schrankengängige Simvastatin hat positive Auswirkungen auf die Häufigkeit von Rezidiven bei der MS (Antel and Miron 2008). Daher fanden wir es besonders wichtig, die Wirkung des Statins Atorvastatin auf MS-sensitive Gene in NPZ zu untersuchen.

Pluchino et al. (2005) sowie Einstein et al. (2006) berichteten, dass bei der EAE die transplantierten NPZ trophische Effekte verstärken und damit die endogene Remyelinisierung stimulieren sowie die Hirnenzündung reduzieren können. Die Autoren Chen et al. (2008) haben in einer Studie den Effekt von Atorvastatin auf NPZ nach Schlaganfall getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass Atorvastatin die NPZ-Proliferation und damit den NPZ-Pool bei Wistar-Ratten erhöht. Außerdem haben Miron et al. (2007) die Wirkung des Simvastatins auf Zellkulturen von Oligodendrozyten neugeborener Ratten und von humanen fötalen Oligodendrozyten sowie von humanen adulten Oligodendrozyten untersucht. Die Studie hat gezeigt, dass Simvastatin signifikante Zeit- und Dosis-abhängige Wirkungen auf zelluläre Prozesse sowie auf die Myelinhomeostase und Myelinreparatur ausübt. Die Befunde weisen auf die Bedeutung einer systemischen immunmodulatorischen Therapie bei NPZ-Behandlungsversuchen der MS hin. Einstein et al. (2007) haben die therapeutische Empfänglichkeit und den Wirkungsmechanismus von NPZ bei der EAE nach vier Injektionen überprüft. Es zeigte sich eine signifikante Besserung der klinischen Symptome sowie eine Reduktion der Entzündungen und Defekte. Auch Aharonowiz et al. (2008) haben den neuroprotektiven Effekt von humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) bei der experimentellen autoimmunem Enzephalomyelitis untersucht. Dabei wurden die oben genannten Zellen in die Ventrikel von EAE-Mäusen transplantiert. Die transplantierten Zellen reduzieren die klinischen Symptomen der EAE signifikant und haben einen neuroprotektiven Effekt auf die ZNS der EAE-Mäuse.

Zusammenfassend ist die Zelltransplantation eine neue wichtige Option in der Behandlung von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, einschließlich der MS (Duncan 2008). In bisherigen Studien wurden verschiedene Zelltypen für die Ersatztherapie benutzt, wie z. B. Schwann-Zellen, Oligodendrozyten, olfaktorische Hüllzellen und embryonale und neuronale Stammzellen (Conti et al. 2006; Kim 2007; Blakemore 2008; Karussis et al. 2008; Pluchino and Martino 2008). Um den Einfluss von Statinen auf NPZ, und dabei insbesondere deren Differenzierungsprozess zu erfassen, haben wir Proteinexpressionen während der frühen Differenzierungsphasen von NPZ aus dem fetalen Striatum der Ratte (ST14A-Zellen) untersucht. Dabei wurden 3 der 4 aus den EAE-Versuchen übernommene Proteine (ICAM-1, HSP105 und COX-1) um die 5 aus den Mikroarrayuntersuchungen bzw. aus der Literatur als Statin-sensitiv bekannten Proteine TSP-1, PTX-3, SOCS-3, Ras und P-STAT-6 ergänzt. Auf das immunzelltypische Protein CD86 wurde verzichtet, da seine Expression auf NPZ unwahrscheinlich war.

Zur Untersuchung der *in vitro* Wirkungen von Atorvastatin auf die Expression der acht genannten Kandidatenproteine in den ST14A-Zellen wurden drei unabhängige In-Zell-Western-Experimente bei der permissiven Temperatur von 33°C und der nicht-permissiven Temperatur von 39°C durchgeführt. Die Atorvastatinexposition erfolgte über drei Zeiträume (4h, 24h und 48h) und in drei unterschiedlichen Atorvastatin-Konzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M). Zunächst wurden mögliche toxische Effekte auf die untersuchten Zellen bestimmt, um toxische Einflüsse der gewählten Testkonzentrationen des Atorvastatins auszuschließen. Dazu wurde die Kresylviolett-färbung nach Nissl angewendet. Die nach Franz Nissl benannte Färbung ist eine histologische Technik, die insbesondere zur Darstellung von vitalem Nervengewebe verwendet wird.

Bei unseren Untersuchungen wurde kein wesentlicher toxischer Statineffekt in den eingesetzten Konzentrationen registriert.

Für die Bestimmung der Proteinexpression wählten wir die In-Zell-Western-Methode, die von LI-COR® Bioscience (Lincoln, Nebraska USA) entwickelt wurde. Da diese Methode Proteine direkt in der Zelle ohne Extraktion nachweist, erhöht sich der Wert der gewonnenen Daten hinsichtlich der Übertragbarkeit auf lebende Organismen. Nach Kultivierung werden die adhärennten Zellen in Mikrotiterplatten fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern, wobei die letztgenannten wie beim Western blot mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind die im Infrarotbereich emittieren. Im Gegensatz zur traditionellen Einkanal-detektion arbeiten LI-COR® Systeme mit zwei voneinander getrennten Fluoreszenzkanälen, was den simultanen Nachweis von zwei Zellstrukturen ermöglicht. Damit kann (a) der Durchsatz gesteigert, (b) die Genauigkeit der Daten erhöht

und (c) eine exakte Quantifizierung erreicht werden. Eine entscheidende Voraussetzung für die präzise Bestimmung der Proteinmenge ist die Normalisierung der Daten, die die Variation der Zellzahl der Proben korrigiert. Das Fluoreszenzsignal im zweiten Kanal wird dazu quantitativ erfasst, wobei das Signal nach der Korrektur von unspezifischem Hintergrundrauschen gegen die unterschiedliche Zellzahl pro Well normalisiert wird. Die Signalerfassung im infraroten Wellenlängenbereich ist für das Nachweisverfahren eine wichtige Voraussetzung. Zellen, Kunststoffreaktionsgefäße und Kunststoffplatten sowie Wirkstoffe können im sichtbaren Fluoreszenzbereich eine signifikante Autofluoreszenz aufweisen. Dieses unspezifische Hintergrundsignal ist im Infrarotbereich stark verringert, sodass es zu einer deutlich höheren Sensitivität und Leistungsfähigkeit der LI-COR® Systeme kommt.

In unserer Studie wurde die In-Zell-Western-Methode in 96-Well-Platten ausgeführt. Die gegen die zu bestimmenden Kandidatenproteine gerichteten primären Antikörper und die mit Infrarotfarbstoffen markierten sekundären Antikörper wurden für die Detektion in fixierten Zellen benutzt und das Fluoreszenzsignal von jedem Well quantifiziert. Im folgenden werden die mit dieser Methode registrierten Expressionsänderungen der 8 oben erwähnten Kandidatenproteine ICAM-1, HSP105, TSP-1, PTX-3, SOCS-3, COX-1, Ras und P-STAT-6 im einzelnen diskutiert.

ICAM-1

Die in unseren Untersuchungen gefundene Heraufregulierung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Atorvastatin-behandelten proliferierenden NPZ war nach den Literaturmitteilungen über vorwiegend suppressorische Statinwirkungen in anderen Systemen und den eigenen Befunden einer leichten Suppression im Rückenmark von EAE-Mäusen nicht zu erwarten.

Im Ischämiemodell der Retina konnten Honjo et al. (2002) zeigen, dass eine Vorbehandlung mit den Statinen Pravastatin und Cerivastatin die Expression von P-Selektin und ICAM-1 sowie die Anzahl apoptotischer Zellen reduziert. Die Statin-vermittelte Unterdrückung des neuronalen Retinatodes könnte daher für die Behandlung verschiedener ischämischer Augenerkrankungen wichtig sein (Honjo et al. 2002; Kawaji et al. 2007). Die Arbeitsgruppe Nakazawa et al. (2007) fand, dass die neuroprotektive Wirkung von Pitavastatin bei Ganglienzellen der Retina mit einer Reduktion der Expression von ICAM-1 verbunden war. Miao et al. (2005) berichteten über die Wirkung von Simvastatin auf die Expression von ICAM-1 mRNA im Gehirn von Neugeborenen mit Ischämie. Das Maximum der Expression

von ICAM-1 war nach 24 Stunden erreicht, und nahm danach schrittweise ab. Sagara et al. (2007) haben den Effekt von Pitavastatin bei der experimentellen choroidalen Neovaskularisation (CNV) von Ratten untersucht. Die Expression von ICAM-1 war signifikant reduziert, woraus geschlossen wurde, dass Pitavastatin die Entstehung einer CNV hemmen kann.

Außerdem gibt es weitere Publikationen über Statin-Effekte auf das ICAM-1 Protein in nicht-neuronalen Zellen. Von den Statinen ist bekannt, dass sie Endothelfunktionen bei Entzündungen durch ICAM-1-Herunterregulierung verbessern können (Tsujikawa et al. 1998; Honjo et al. 2002). Humane Endothelzellen aus Nabelvenen (HUVEC) wurden mit TNF- α und mit Rosuvastatin inkubiert, wobei das Statin die Expression von ICAM-1 inhibierte. Die Autoren weisen darauf hin, dass die anti-entzündliche Aktivität von Rosuvastatin mit Inhibition von JNK und NF- κ B verbunden ist (Kim et al. 2007). Schließlich wurde auch eine Hemmung von ICAM-1 durch Simvastatin in humanen Endothelzellen beschrieben (Jiang et al. 2007).

Die embryonalen Stammzellen (ESZ) der Maus wurden von Tian et al. (1997) untersucht. Die Autoren beweisen, dass das ICAM-1 und das NCAM und VCAM vermehrt in undifferenzierten ESZ exprimiert und in differenzierten ESZ runterreguliert wird. Hartlage-Rübsamer and Schliebs (2001) haben die funktionelle Rolle der ICAM-1 bei neurodegenerativen Prozessen *in vivo*, bei basalen Vorderhirnläsionen mit der Western-Blot-Methode überprüft. Diese zeigte schon nach vier Tagen der Läsion einen Anstieg der ICAM-1-Expression, die am Tag 7 besonders ausgeprägt war. NPZ wurden nach der Induktion einer EAE intraventrikulär transplantiert, was eine Reduktion perivaskulärer Infiltrationen auslöste und zur Minderung der Expression von ICAM-1 und LFA-1 führte (Einstein et al. 2003). Dieselben Autoren haben die gleichen NPZ sechs Tage nach der Induktion einer EAE transplantiert, was die Anzahl der T-Zellen steigerte und die Reduktion der Expression von ICAM-1 und LFA-1 im Gehirn reduzierte (Einstein et al. 2006). Das ICAM-1 und VCAM-1 wurden nach einer unilateralen Nervenschädigung in den peripheren gustatorischen Leitungsbahnen hochreguliert (Cavallin and McCluskey 2007).

Der Mechanismus der von uns gefundenen Verstärkung der ICAM-1-Expression in striatalen NPZ der Ratte ist z. Zt. noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

HSP105

Die HSP105-Expression wurde in unseren Untersuchungen in proliferierenden NPZ durch Atorvastatin überwiegend gesteigert, insbesondere bei der höchsten Konzentration von 10^{-5} M. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit dem starken Stimulationseffekt von Atorvastatin in EAE-Lymphknoten und in Lymphknoten und im Rückenmark von Kontrollmäusen. Wie bereits in der Diskussion der Western-Blot-Ergebnisse angedeutet, verglichen Schmeer et al. (2008) die Expression von HSP27-Protein bei normalen und ischämischen Ratten nach der Behandlung mit Simvastatin. Nach 72 Stunden war die Expression von HSP27 durch die Statin-Wirkung in der ischämischen Retina erhöht. Daher könnten Statine für die Behandlung verschiedener neuronaler Schädigungen des ZNS neue Möglichkeiten eröffnen.

Für HSP105 sind Statineffekte in der Literatur bisher nicht beschrieben. In FM3A-Zellen der Maus wurden zwei Formen von HSP105, HSP105A und HSP105B, gefunden (Hatayama et al. 1997; Ishihara et al. 1999). Beide spielen eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung der Mäuse ab dem 8. Embryonaltag. Der Level stieg bis zum Embryonaltag 11 an und fiel danach bis zum Embryonaltag 14 wieder ab (Hatayama et al. 1997). Bei der Ratte wird HSP105 in verschiedenen Geweben, wie Nieren, Milz, Leber und Herz, ebenfalls in den beiden Isoformen HSP105A und HSP105B exprimiert (Wakatsuki and Hatayama 1998). Auch bei verschiedenen Tumoren, wie Rektum- und Pankreasadenokarzinom, Schilddrüsen-, Ösophagus- und Thymustumoren sowie Magenadenolymphom, Seminom und Melanom wird HSP105 vermutlich im Zuge einer Anti-Tumorreaktion hochreguliert (Kai et al. 2003), weshalb es als Marker für Tumorerkrankungen gilt (Kai et al. 2003; Muchemwa et al. 2008). Für die Immunantwort bei der MS und EAE spielt es eine regulatorische Rolle (Minohara 2003).

Wegen seiner überwiegend zytoprotektiven Wirkungen kann vermutet werden, dass die Statin-bedingte Hochregulierung von HSP105 einen positiven Einfluss auf die NPZ-Entwicklung hat.

Thrombospondin-1 (TSP-1)

Das Matrixprotein TSP-1 wurde durch Atorvastatin sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden NPZ jeweils bei der höchsten Statinkonzentration von 10^{-5} M hochreguliert. Ähnlich wie beim ICAM-1 steht dieser Befund im Gegensatz zu den meisten Literaturmitteilungen über Statineffekte in anderen Zellsystemen. So fanden z.B. Loboda et

al. (2006), dass Atorvastatin die Expression von TSP-1 in Endothelzellen humaner Mikrogefäße unterdrückt. Ähnliche Befunde erhielten Boerma et al. (2006) und Martinez-Sales et al. (2007) an humanen Nabelvenenendothelzellen (HUVEC). Der Effekt wurde durch Mevalonat, Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) aufgehoben (Martinez-Sales et al. 2007). Die Arbeitsgruppe von McGillicuddy et al. (2006) stellte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von TSP-1 nach Behandlung mit Fluvastatin in glatten Muskelzellen humaner Koronararterien (HCASMC) fest. Weiterhin gibt es Mitteilungen über die Herunterregulierung von TSP-1 in Zellkulturen von humanen Gefäßmuskelzellen nach Inkubation mit Lovastatin und Simvastatin (Riessen et al. 1999) sowie in humanen arteriellen glatten Muskelzellen nach Behandlung mit Cerivastatin (Siegel-Axel et al. 2003). In allen diesen Fällen könnte die Reduktion des TSP-1 einen positiven therapeutischen Effekt auf die Endothel- und Gefäßmuskelfunktion haben. Andererseits spielt TSP-1 als komplexes, multifunktionelles Matrixprotein eine wichtige physiologische Rolle in zahlreichen Zelltypen, wie Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen, in denen es die Zelladhäsion und Zellproliferation reguliert und damit an der Angiogenese bei Entzündungsprozessen und Karzinomen beteiligt ist (Bonney et al. 2008). TSP-1 ist eine entscheidende Komponente der Abwehrmechanismen in der Grenzzone eines Herzinfarktes. Die selektive endogene Expression von TSP-1 in der Infarkt-Grenzzone kann als Barriere zur Abgrenzung gegen Bindegewebsgranulationen dienen sowie als Schutz gegen fibrösen Umbau des nicht infarzierten Myokards (Frangogiannis et al. 2005; Chatila et al. 2007). Die lokale TSP-1-Expression kann die Entzündung durch Aktivierung von TGF- β oder durch Inhibierung der lokalen Angiogenese supprimieren (Frangogiannis et al. 2005). Für das Tumorwachstum stellt es einen potentiellen Inhibitor dar, was durch die Hemmung der Angiogenese und die Aktivierung von TGF- β sowie durch eine direkte Wirkung auf die Migration und das Überleben von Endothelzellen bedingt ist (Miao et al. 2001; Lawler 2002; Kazerounian et al. 2008). Außerdem supprimiert TSP-1 das Tumorwachstum durch Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche und Regulation von extrazellulären Proteasen (Kazerounian et al. 2008).

Die Stromazellen des Knochenmarks (BMSCs) und die ganglionären Zellen der Retina (RGCs) sind potentielle Kandidaten für die Zellersatztherapie bei degenerativen Erkrankungen und Traumen im ZNS. Hierbei kann der TSP-1-Signalweg die neuronale Transdifferenzierung der BMSCs und RGCs fördern (Yu et al. 2008).

Damit könnte auch die Statin-induzierte Heraufregulierung von TSP-1 in unseren NPZ eine positive Rolle für die Differenzierung spielen. Die Aufklärung des Stimulationsmechanismus bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

PTX-3

Das von uns untersuchte akute Phasenprotein PTX-3 darf nicht mit dem häufig auch als PTX-3 abgekürzten Pituitary homeobox protein-3 verwechselt werden (Castelo-Branco et al. 2003). Es hat als Entzündungsmediator Bedeutung (Han et al. 2005; Boehme et al. 2007) und wird als Reaktion auf primäre Entzündungssignale wie Lipopolysaccharide, IL-1 β und TNF in Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen induziert (Lee et al. 1993; Introna et al. 1996; Botazzi et al. 1997; Goodman et al. 2000; Polentarutti et al. 2000; Garlanda et al. 2005). Normalerweise ist sein Plasmaspiegel sehr niedrig (≤ 2 ng/ml). Er steigt aber bei verschiedenen pathologischen Prozessen an (Müller et al. 2001; Presta et al. 2007). Daher gilt es als ein sensibler Marker in der Frühdiagnostik und für die Prognose verschiedener Erkrankungen (Peri et al. 2000; Latini et al. 2004; Okutani 2006). Z. B. wird es im Gehirn nach einem Insult hochreguliert und kann dort eine präventive Bedeutung für die Insult-induzierte Neurodegeneration besitzen. Hier war es in Gliazellen, aber nicht in Neuronen exprimiert (Ravizza et al. 2001). Bei der EAE wurde es in neuronalen Zellen und Astrozyten gefunden (Agnello et al. 2000; Polentarutti et al. 2000; Ravizza et al. 2001). Während der aktiven EAE-Phase an den Tagen 10 bis 14. n.i. war es hochreguliert, am 30. Tag n.i. noch vorhanden und erst am 60. Tag n.i. nicht mehr nachweisbar (Agnello et al. 2000). Einige Mitglieder der Pentraxin-Familie sind an neuronalen Funktionen (NP1, NP2), der Regulation der Neurodegeneration (NP1, PTX-3) und der Konstruktion der zellulären Matrix (PTX-3, SAP) sowie an der femininen Fertilität beteiligt (Garlanda et al. 2005; Tranguch et al. 2007). Morikawa et al. (2004) haben mittels DNA-Mikroarray die Änderungen der Genexpression in humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC), in humanen glatten Muskelzellen der Koronararterien (HCASMC) und in humanen Hepatokarzinomzellen (Hep G2) nach der Behandlung mit Atorvastatin und Pitavastatin untersucht. In den HUVEC-Zellen wurden fünf durch Statine besonders stark supprimierte Gene, einschließlich PTX-3, gefunden. Auch wurde das PTX-3 als wichtiger Indikator für den Schweregrad beim Herzinfarkt identifiziert (Peri et al. 2000). Seine Expression konnte besonders in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Napoleone et al. 2002; Rolph et al. 2002). Die Reduktion des PTX-3 auf mRNA-Level zählt hier zu den positiven klinischen Wirkungen der Statine. Von besonderer Bedeutung ist des weiteren die Expression von PTX-3 in dendritischen Zellen und Makrophagen mit Implikationen für die angeborenen Immunitäts- und Entzündungsprozesse (Garlanda et al. 2005) in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Adipozyten, Fibroblasten, Phagozyten und dendritischen Zellen (Doni et al. 2003; Klouche et al. 2004), bei der Castleman-Krankheit und beim Kaposi-Sarkom (Malaguarnera et al. 2000; Klouche et al.

2002) sowie in den humanen NPZ NTera2/D1 (NT2) (Misiuta et al. 2006). Schließlich wurde auch eine PTX-3-Expression in den Herz- und Skelettmuskeln gefunden (Polentarutti et al. 2000).

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen ist vor allen von Interesse, dass PTX-3 bei der EAE, die mit Entzündungen einhergeht, hochreguliert wird (Agnello et al. 2000) und seine Expression in NPZ, wie den ST14A, durch Statine, wie Atorvastatin, herabreguliert werden kann. Wir würden allerdings dem eigenen Befund einer Suppression von PTX-3 keine allzu große Bedeutung beimessen, da die Suppression bei der niedrigsten Atorvastatinkonzentration von 10^{-7} M, nur in differenzierenden Zellen und nur nach 4 Stunden Inkubationszeit auftrat.

SOCS-3

Der negative Regulator von Zytokin-Signalen, SOCS-3 erhöht seine Expression nach Verletzungen (Carmichael 2003). Zusammen mit weiteren Mitgliedern der SOCS-Familie (SOCS-1 und SOCS-2) besitzt er Bedeutung für die Entwicklung des ZNS (Polizzotto et al. 2000).

Die Arbeitsgruppe um Stark and Cross (2006) hat die Expression von SOCS-1 und SOCS-3 im Rückenmark von SJL und B6 Mäusen bei der EAE bestimmt, wobei die SJL Mäuse eine schubförmige EAE und die C57BL/6 (B6) Mäuse eine mehr chronische Verlaufsform der EAE aufwiesen. Es zeigte sich, dass die B6 Mäuse mehr SOCS-1 und die SJL Mäusen mehr SOCS-3 exprimierten.

Cao et al. (2006) haben die Wirkungen von SOCS-3 auf das Schicksal neuraler Stammzellen untersucht, die von Feten der Wistar-Ratte am 17.-18. Embryonaltag isoliert wurden. Die Autoren stellten fest, dass eine Überexpression von SOCS-3 die Neurogenese induzierte, die Astrogliogenese der neuralen Stammzellen inhibierte und die Stabilisierung der neuralen Stammzellen förderte. Die Stabilisierung der neuralen Stammzellen erfolgte vermutlich durch gleichzeitige Hochregulation von Notch1. Die Statinwirkung auf die Expression von SOCS-3 haben Huang et al. (2003) in Makrophagen von Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Lovastatin und Fluvastatin stimulierend auf die mRNA-Expression von SOCS-3 wirken. Dieser Effekt war spezifisch für SOCS-3 und konnte durch Mevalonat, FPP und GGPP blockiert werden. Zhang et al. (2008) stellten fest, dass Simvastatin die Expression von SOCS-3 und SOCS-7 in Monozyten erhöht.

In unseren NPZ der Ratte reagierte SOCS-3 ähnlich wie PTX-3 auf Atorvastatin nur vorübergehend, d.h. nur nach 4h Inkubationszeit und auch nur auf die niedrigste Konzentration von 10^{-7}M , allerdings im Gegensatz zum PTX-3 und in Übereinstimmung mit den genannten Literaturbefunden mit einer Hochregulation. Einen wesentlich stärkeren Einfluss als auf PTX-3 übte Atorvastatin in unseren Versuchen auf die COX-1-Expression aus.

COX-1

COX-1 ist in allen Neuronen des Gehirns vorhanden, jedoch vermehrt im Vorderhirn (Vane et al. 1998). Das Molekül spielt eine entscheidende Rolle während die Entwicklung in den Stammzellen der Retina des Huhns. Dabei wurde das Molekül besonders stark am embryonalen Tag 7 hochreguliert (Paraoanu et al. 2005). Won-Kyu and Neufeld (2002) haben immunhistochemisch die zelluläre Expression und die Lokalisation von COX-1 und COX-2 in der Retina von Mäusen und Ratten mit denen der humanen Retina verglichen. Bei Mäusen wurde eine COX-1-Immunreaktivität in Photorezeptorzellen, Mikroglia, retinalen, amakrinen und Ganglienzellen beobachtet, bei Ratten wurde COX-1-Immunreaktivität in der Mikroglia, den amakrinen Zellen und retinalen Ganglienzellen registriert, und beim Menschen wurde das COX-1-Molekül in den Ganglienzellen, Astrozyten und in amakrinen-Zellen gefunden. Bei Mäusen und Ratten wurde in allen plexiformen Schichten, Ganglienzellen und amakrinen Zellen COX-2 nachgewiesen. Dagegen wurde in der menschlichen Retina die COX-2-Immunreaktivität nur in den plexiformen Schichten gefunden. Shin et al. (2003) haben die Expression von COX-1 und COX-2 bei der experimentellen Autoimmunneuritis untersucht. Im Western blot waren beide Moleküle am Kumulationspunkt der Krankheit signifikant erhöht, wobei das COX-1 nur in den Makrophagen vorhanden war. Aber auch bei der Gehirnschämie war eine dramatische Erhöhung der beiden Moleküle COX-1 und COX-2 feststellbar (Candelario-Jalil and Fieblich 2008). COX-1 und COX-2 werden beide in neuronalen Zellen exprimiert (Kaufmann et al. 1997), jedoch fanden Schneider et al. (2001) in den Neuroblastom-Zelllinien Neuro2a und NG108 der Maus nur COX-1. Bei der Alzheimer-Krankheit wurde die Expression von COX-1 in Mikrogliazellen und das COX-2 in Neuronen detektiert (Hoozemans et al. 2001). Bei der Vorbehandlung von PC12 Zellen aus dem Phäochromozytom der Ratte mit NGF war der mRNA-Level von COX-1 schon 6 Stunden nach der Behandlung erhöht (Kaplan et al. 1997).

Daten über Statin-Effekte auf das COX-1 konnten in der Literatur bislang nicht ermittelt werden. Die meisten Publikationen über Statin-Wirkungen auf Cyclooxygenasen betreffen das COX-2.

In der neueren Literatur wird ein positiver Einfluss der Statine auf verschiedene physiologische Prozesse, inklusive eines Antitumoreffekts beschrieben (Konturek et al. 2007). Die überwiegende Anzahl der Mitteilungen konstatiert eine suppressorische Wirkung der Statine auf die COX-2-Expression bei unterschiedlichen Tumorzellarten. Konturek et al. (2007) beschreiben die Antitumorwirkungen von Simvastatin aufgrund einer Induktion von Apoptose und Inhibition von COX-2. Die Arbeitsgruppe um Habib et al. (2007) hat den Effekt von Simvastatin und Mevastatin auf die COX-2-Induktion der humanen Monozytenzelllinie U937 untersucht. Nach einer 24-stündigen Vorbehandlung der U937-Zelllinie mit Simvastatin oder Mevastatin wurde eine signifikante Reduktion der COX-2-Expression festgestellt.

Die von Hoque et al. (2008) beschriebenen Befunde, dass Lovastatin und Simvastatin in Krebszellen der Prostata die Aktivierung von RhoA und die Expression von c-JUN, jedoch nicht die COX-2-Expression supprimieren, stehen im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen.

Beim Einsatz von Statinen in der Kardiologie und deren Einfluss auf die COX-2-Expression kommt es zu einer überwiegenden Hochregulation der COX-2-Expression. Die Statine reduzieren die Größe des Herzinfarktes in Abhängigkeit von der Dosis. Dieser Effekt ist mit der Hochregulation von COX-2 und der Prostacyclin (PGI₂)-Produktion verbunden (Birnbäum et al. 2007). Ye et al. (2008) bestätigen, dass die Vorbehandlung mit Atorvastatin die Größe des Infarkts reduziert und die Expression von eNOS, iNOS und COX-2 bei der Ratte induziert (Ye et al. 2008). Simvastatin verstärkt die Induktion der COX-2-Expression in vaskulären Muskelzellen (Gonzalez-Diez et al. 2008). Außerdem erhöht Atorvastatin den Prostaglandingehalt des Myokards durch Aktivierung von COX-2 (Ye et al. 2007).

COX-2 wird überwiegend in kortikalen Neuronen und Neuronen des limbischen Systems von männlichen adulten Sprague-Dawley-Ratten exprimiert (Yamagata et al. 1993).

Unsere Befunde einer überwiegenden Suppression von COX-1 durch Atorvastatin decken sich nur partiell mit den Mitteilungen über die Statinbeeinflussung von COX-2 und dabei vor allem mit Befunden aus der Tumorkliteratur. Allerdings fehlen in der Literatur Befunde über die Wirkung von Atorvastatin auf die COX-1- und COX-2-Expression in NPZ.

In Tumorzellen ist ein ähnlicher Wirkungsmechanismus der Statine auf die COX-2-Expression wie auf die COX-1-Expression in unseren NPZ zu vermuten, im Herzmuskelzellen hingegen ein unterschiedlicher Mechanismus.

Ras

Die Mitglieder der Ras-Protein-Superfamilie, welche die Proteine, Ras, Rap1a, Rac und Rho einschließen, sind Membran-gebundene kleine GTPasen, die an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind. So fördert beispielsweise das Ras-Protein das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von eukaryotischen Zellen (Holstein et al. 2002). Für die Signaltransduktion von GTP-bindenden Proteinen, wie Ras, Rap1, RhoA und RhoB spielt deren Isoprenylierung eine entscheidende Rolle (Casey and Seabra 1996; Liao 2002). Durch die Inhibierung der Synthese von L-Mevalonsäure unterdrücken Statine den Aufbau von wichtigen isoprenoiden Zwischenprodukten des Cholesterinbiosynthese-Signalwegs, wie FPP und GGPP (Goldstein and Brown 1990), die eine kovalente Bindung und subzelluläre Lokalisation von Membran-gebundenen Proteinen ermöglichen. Die Mitglieder der Ras und Rho GTPasen sind als bedeutende Substrate der Isoprenylierung wichtige Ziele für die Inhibition durch Statine (Liao 2002; Waiczies et al. 2005). Die Inhibition kleiner GTPasen ist daher für die Vermittlung biologischer Effekte der Statine von großer Bedeutung (Liao 2002). Von Laufs and Liao (1998) wurden humane Endothelzellen mit dem Statin Mevastatin in Anwesenheit von L-Mevalonate, FPP und GGPP inkubiert, was durch Inhibierung der Rho-Geranylierung zur Hochregulierung von eNOS führte. Nach Untersuchungen von Meske et al. (2003) führt die Behandlung einer primären Neuronenkultur der Ratte zur Reduktion der Rho-GTPase-Fraktion und des Levels kleiner G-Proteine. Bassa et al. (1999) haben die Bedeutung der Inhibition des Cholesterin-Signalwegs auf Ras in Mesangiumzellen untersucht. Die Daten weisen darauf hin, dass bei der Inhibition die Mevalonsäure-Synthese durch Lovastatin auch die Aktivität von Ras gehemmt wird. Ähnliche Befunde wurden von der Arbeitsgruppe Danesch et al. (2002) beschrieben. Das Simvastatin unterdrückte die Rho-GTPase in glomerulären Mesangiumzellen. Zahlreiche *in vitro* Studien von malignen Zellen zeigen die inhibitorische Wirkung von hohen Statin-Dosen (10-50 μ M) auf die Isoprenylierung von Ras- und Rho-GTPasen (Goldman et al. 1996; Holstein et al. 2002; Ghittoni et al. 2005). Lovastatin, jedoch nicht Pravastatin, unterdrückte das Zellwachstum und das Überleben von Zellen durch Induktion von Apoptose in Neuroblasten. Mevalonate verhinderten die morphologischen und biochemischen Zeichen der Apoptose, die durch Lovastatin induziert wurden (Garcia-Roman et al. 2001). In ähnlicher Weise induzierte Lovastatin die Apoptose in

Zelllinien eines Mesothelioms, wobei wiederum die Wirkung durch Zusatz von Mevalonaten aufgehoben wurde. Das bestätigte, dass Lovastatin die Mesotheliomzellen durch die Inhibition von Mevalonaten beeinflusste (Rubins et al. 1998). Khanzada et al. (2006) untersuchten die Wirkung von Simvastatin auf das Wachstum und das Überleben der humanen SCLC-Tumorzellen der Lunge. Das Simvastatin inhibierte das Wachstum der SCLC-Zellen und darüber hinaus den Anteil des H-Ras-Proteins. Auf der anderen Seite förderte die Inhibition von Funktionen der Rho-Familie durch Lovastatin die Wiederherstellung von Myelin bei der EAE (Paintlia et al. 2008a), während nach Tanaka et al. (2000) die Mevalonat-Kaskade für die Differenzierung, Reifung und Aufrechterhaltung von neuronalem Gewebe eine positive Rolle spielt. Die gleichen Autoren behaupten, dass die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase die membran-gebundenen kleinen GTPasen Rho, aber nicht die kleinen GTPasen Ras supprimiert. Unsere Ergebnisse einer Ras-Unterdrückung durch hohe Atorvastatinkonzentrationen sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden NPZ stehen in Übereinstimmung mit den meisten Literaturmitteilungen über Statineffekte in unterschiedlichen Zellsystemen. Es gibt aber auch Berichte, in denen eine fördernde Wirkung der Statine auf das Ras-Protein beschrieben wird. So wurde z.B. die humane Erythroleukämie-Zelllinie K562 mit 10 μ M Lovastatin für 0-24 Stunden inkubiert, was zu einer wesentlichen Erhöhung des Levels von Ras, RhoA, RhoB und Rap1a zu allen Zeitpunkten führte. Bei gleichzeitiger Zelleninkubation mit Lovastatin und Mevalonat wurde der Lovastatin-Effekt aufgehoben (Holstein et al. 2002).

P-STAT-6

Die STAT-Proteine gehören zur Familie der latenten Transkriptionsfaktoren, die in vielen Zelltypen gebildet werden. Die STAT-4- und STAT-6-Gene spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der EAE (Chitnis et al. 2001). Ihre Expression und durch Phosphorylierung vermittelte Aktivierung wird durch Statine beeinflusst.

Youssef et al. (2002) haben z.B. den Effekt von Atorvastatin *in vivo* auf die T-Zellen bei der EAE untersucht. Hier induzierte das Atorvastatin die Phosphorylierung von STAT-6 zu P-STAT-6 und die Sekretion von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-5 und IL-10) sowie des transformierenden Wachstumsfaktors TGF- β . Rodriguez et al. (2005) beschreiben, dass Atorvastatin die EAE über die Induktion der Phosphorylierung von STAT-6 und die Inhibition von STAT-4 unterdrückt. Ebenso gibt es Publikationen über einen Lovastatin-Effekt auf das P-STAT-6-Protein (Nath et al. 2004). Die *in vivo* Behandlung von SJL/J

Mäusen mit Lovastatin reduzierte die Dauer und den Schweregrad der aktiven und passiven EAE. Lovastatin induzierte einerseits die Expression von GATA3 und die Phosphorylierung von STAT-6 und andererseits die Inhibition von STAT-4 (Nath et al. 2004). Aprahamian et al. (2006) haben die Simvastatinwirkung auf entzündliche Rückkopplungsmechanismen in einem Atherosklerose-Model der Maus getestet. Die Daten weisen darauf hin, dass Simvastatin die Atherosklerose unabhängig von seiner Cholesterol-senkenden Wirkung verbessert und dass seine immunmodulatorischen Effekte mit einer Induktion der Expression von STAT-6 sowie einer Unterdrückung von STAT-4 verbunden waren. Im Gegensatz dazu haben Thomas et al. (2005) bei der experimentellen Autoimmun-Uveitis mittels Western-Blot-Methode gezeigt, dass das phosphorylierte STAT-6 nicht hochreguliert wurde, weder bei den Versuchstieren noch bei den Kontrolltieren. Hingegen wurde das STAT-4 in beiden Gruppen hochreguliert.

Unser Befund einer Hochregulierung von P-STAT-6 durch die niedrige und mittlere Atorvastatinkonzentration in Langzeit-differenzierenden NPZ steht in Übereinstimmung mit den in der Literatur mitgeteilten EAE-Ergebnissen. Er sollte aber wegen der extrem hohen Standardabweichung der Messwerte von > 700% nicht überbewertet werden.

4.5. Ausblick

Die vorgestellten Untersuchungen zum Statineinfluß auf die Gen- und Proteinexpression im Tiermodell der MS und auf die Proteinexpression in striatalen NPZ der Ratte haben es ermöglicht, neue Kandidaten-Proteine zu identifizieren, die potentiell Indikatorcharakter für die Untersuchung von Statin-Respondern und -Nichtrespondern unter Patienten mit MS und möglicherweise anderen entzündlichen und degenerativen Erkrankungen des Nervensystems, wie z.B. der Parkinsonerkrankung, haben könnten. Hierzu sind weitere Untersuchungen, insbesondere an humanen NPZ, notwendig. Die Ergebnisse an den Ratten-NPZ sind derzeit noch uneinheitlich und erfordern eine Reproduzierung der gefundenen signifikanten Statineffekte mit alternativen Methoden. Hierzu stehen sowohl Methoden der Proteomanalyse (2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit differentieller Gelfärbung und massenspektrometrischer Auswertung) als auch ELISA-Systeme zur Verfügung. Die funktionelle Bedeutung der in dieser Arbeit identifizierten Statin-sensitiven Gene könnte durch selektive Genausschaltung (knock-out) bzw. -unterdrückung (knock-down) und anschließende Analyse der morphologischen und biochemischen Konsequenzen (Markerexpression) in verschiedenen NPZ-Linien aufgeklärt werden. Um näheren Aufschluß

über den Mechanismus der Statinwirkung auf die Proteinexpression zu erhalten, wären die von kleinen GTPasen-abhängigen Signalwege in den untersuchten NPZ zu analysieren. Schließlich sind Untersuchungen in weiteren Krankheitsmodellen in Betracht zu ziehen. Im Tiermodell der Parkinsonerkrankung gibt es bereits Hinweise (Wang et al. 2005; Hernández-Romero et al. 2008; Schuster et al. 2008) auf Statineffekte, die therapeutische Konsequenzen haben könnten und Grundlage eines geplanten Forschungsprojektes sind.

5. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Statins Atorvastatin auf die Expression von Genen untersucht, welche für die Pathogenese der EAE und vermutlich auch für die der MS von Bedeutung sind. Zur Angleichung unserer experimentellen Studie an die klinische Situation haben wir das Tiermodell der PLP-139-151 induzierten EAE gewählt und damit einen Verlauf erreicht, der der Initialphase einer chronisch-schubförmigen MS stark ähnelt. Im Vergleich zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergaben sich in unserer Studie folgende Unterschiede:

- a) Wir verwendeten männliche EAE-susceptible SJL Mäuse, um den Einfluss des weiblichen Hormonzyklus auf den Krankheitsverlauf auszuschließen;
- b) es wurden Zellen aus drainierenden Lymphknoten und keine T-Zelllinien untersucht;
- c) die basale und stimulierte Proliferation der Lymphozyten der gesunden Kontrolltiere war höher als die in vergleichbaren anderen Studien.

Atorvastatin wurde eingesetzt, weil es ein typisches, in der Klinik häufig verwendetes Statin darstellt. Die Behandlung erfolgte an 7-Wochen alten Mäusen mit 10 mg Atorvastatin pro kg Körpergewicht. Es wurden folgende experimentelle Tiergruppen gebildet:

- A: normale gesunde Kontrolltiere (Tag 0 n.i.),
- B, C und D: EAE-Mäuse an den Tagen 10, 20 bzw. 30 n. i.,
- E und F: Kontrolltiere, die 10 bzw. 20 Tage Atorvastatin erhielten, aber nicht immunisiert wurden, und
- H: EAE-Mäuse, die ab Tag 10 n.i. 10 bzw. 20 Tage lang Atorvastatin erhielten.

Zur Identifizierung der Statin-sensitiven Gene wurde in den Lymphknoten und im Rückenmark der verschiedenen EAE-Tiergruppen eine Microarrayanalyse der Genexpression durchgeführt. Die Analyse umfasste 12.000 Gene. Eine um das Zweifache geänderte Expression im Vergleich zweier Tiergruppen wurde in Übereinstimmung mit den meisten Literaturmitteilungen und vorausgegangenen eigenen Microarray-Untersuchungen in anderen Systemen als signifikant angesehen. Mit der Mikroarray-Analyse wurden 14 Gene identifiziert, deren Expression selektiv von Atorvastatin beeinflusst war. Davon wurden 2 Gene für eine Expressionsanalyse auf Proteinebene ausgewählt, und zwar das proinflammatorische Enzym COX-1 und das Stressmolekül HSP105. Hinzu kamen das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 und das Lymphozytenfunktionsmolekül CD86, die beide aus der Literatur als Statin-sensitive bekannt waren. Zur Untersuchung der Veränderungen auf Proteinebene wurde die quantitative Western-Blot-Methode der Firma LI-COR® Bioscience mit Detektion im nahen Infrarotbereich benutzt. Im Ergebnis wurde

gefunden, dass die Expression der 4 untersuchten Proteine sowohl in Lymphknoten als auch im Rückenmark der Versuchstiere durch die Induktion der EAE und mehr noch durch die Atorvastatinbehandlung beeinflusst war und dass das Ausmaß der Expressionsänderungen von der Dauer der EAE und der Statinbehandlung abhing. Außerdem erwiesen sich die Proteine auch in gesunden Kontrollmäusen als Statinsensitiv. Insgesamt zeigte sich ein heterogenes Bild der Proteinexpressionsänderungen, das nur partiell die Änderungen auf Transkriptionsebene widerspiegelte.

Ergänzend zu den *In-vivo*-Untersuchungen im EAE-Modell wurden Atorvastatineffekte auf die Expression von Kandidatenproteinen in neuronalen Vorläuferzellen *in vitro* untersucht, um Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung regenerativer Prozesse im Nervengewebe durch Statine zu erhalten. Für diese Untersuchungen wurde als Modell die immortalisierte striatale Vorläuferzelllinie ST14A der Ratte benutzt. Die Auswahl der Kandidatenproteine erfolgte auf der Basis der Ergebnisse der Gen- und Proteinexpressionsanalyse im EAE-Modell (ICAM-1, HSP105, TSP-1, PTX-3, SOCS-3, COX-1) und auf Grund von Literaturhinweisen auf Statinsensitive Proteine in ähnlichen Systemen (Ras und P-STAT-6). Zunächst wurden toxische Atorvastatin-Effekte auf die ST14A14A-Zellen mittels Nissl-Färbung um toxische Statinkonzentration bei der Testung überprüft. Danach wurde die basale Expressionskinetik der Kandidatenproteine in den ST14A-Zellen ermittelt und schließlich der Einfluss des Atorvastatins auf die Expressionskinetik untersucht. Dafür kam die In-Zell-Western-Methode zur Anwendung, die ebenso wie die Western-Blot-Methode auf der Proteindetektion mit fluoreszenzmarkierten Antikörper beruht, die Lichtsignale im nahen Infrarotbereich emittieren. Es wurden drei unabhängige In-Zell-Western-Experimente bei permissiver Temperatur von 33°C an proliferierenden Zellen und bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C an differenzierenden Zellen durchgeführt. Die Atorvastatinexposition erfolgte über 3 verschiedene Zeiträume (4h, 24h und 48h) und in 3 verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M).

Im Ergebnis zeigte sich, dass die Statinwirkung proteinbezogen sehr unterschiedlich ausfiel. So wurden ICAM-1 und HSP105 nur in proliferierenden Zellen, PTX-3, SOCS-3 und P-STAT-6 nur in differenzierenden Zellen und TSP-1, COX-1 und Ras sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden Zellen beeinflusst. Hochreguliert wurden ICAM-1, TSP-1, SOCS-3 und P-STAT-6, herunterreguliert PTX-3 und Ras. Eine Abhängigkeit der Expressionsänderung ergab sich nur für HSP105 und COX-1. HSP105 wurde in proliferierenden Zellen nach 48h Inkubationszeit bei 10^{-5} M Atorvastatin heraufreguliert und bei 10^{-7} M herunterreguliert. COX-1 wurde überwiegend herunterreguliert, und zwar in proliferierenden Zellen nach 4h bei 10^{-6} M und 10^{-7} M Atorvastatin und nach 24h

bei 10^{-7} M Atorvastatin sowie in differenzierenden Zellen nach 4h bei 10^{-7} M Atorvastatin. Eine Hochregulation wurde in differenzierenden Zellen nach 24h bei 10^{-5} M Atorvastatin beobachtet. Die Dauer und Stärke der Statineinwirkung spielte auch bei den anderen Proteinen eine entscheidende Rolle für die Richtung und das Ausmaß der Expressionsänderung. Dabei reagierten ICAM-1, HSP105 und P-STAT-6 nur auf Langzeitexposition (48h) sowie PTX-3 und SOCS-3 nur auf Kurzzeitexposition (4h). TSP-1 wurde nur von der höchsten und PTX-3 und SOCS-3 nur von der niedrigsten Statinkonzentration beeinflusst.

Insgesamt wird aus den Untersuchungsergebnissen der Statinbeeinflussung von Gen- und Proteinexpression im Tiermodell der EAE und der Proteinexpression in neuronalen Vorläuferzellen der Ratte geschlossen, dass die untersuchten Proteine potentiell Indikatorcharakter für Responder und Nichtresponder unter verschiedenen Tierstämmen und möglicherweise auch MS-Patienten haben. Die Aufklärung des exakten Mechanismus der beobachteten Statineffekte und ihrer funktionellen Bedeutung bedarf weiterer Untersuchungen, z. B. mittels selektiver Genunterdrückung (knock-down) und -überexpression (knock-in).

6. Literaturverzeichnis

- Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Chiellini C, Maffei M, Grimaldi P, Bonino F, Moustaid-Moussa N, Pasqualini F, Mantovani A, Ailhaud G, Amri EZ (2003) Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNF α -induced secreted protein of adipose cells. *J Lipid Res* 44:994-1000
- Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M (2007) Statins as immunomodulators in systematic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1110:670-680
- Adams JC (2001) Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:25-51
- Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N (1998) Growth hormone preferentially induced the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signalling. *J Biol Chem* 273:1285-1287
- Aelst LV, D'Souza-Schrorey (1997) Rho GTPases and signalling networks. *Gen Dev* 11:2295-2322
- Agnello D, Carvelli L, Muzio V, Villa P, Botazzi B, Polentarutti N, Mennini T, Mantovani A, Ghezzi P (2000) Increased peripheral benzodiazepine binding sites and pentraxin 3 expression in the spinal cord during EAE: reaction to inflammatory cytokines and modulation by dexamethasone and rolipram. *J Neuroimmunol* 22:105-111
- Aharonowiz M, Einstein O, Fainstein N, Lassmann H, Reubinoff B, Ben-Hur T (2008) Neuroprotective effect of transplanted human embryonic stem cell-derived neural precursor in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 3:e3145
- Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB (2007) Simvastatin potentiates TNF- α -induced apoptosis through the down-regulation of NF- κ B-dependent antiapoptotic gene products: role of κ B α kinase and TGF- β -activated kinase-1. *J Immunol* 178:2507-2516
- Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, Dorr J, Seeger B, Prozorovski T, Sallach S, Brocke S, Nitsch R, Zipp F (2003) Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J Exp Med* 197:25-733
- Alexandr WS, Hilton DJ (2004) The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 22:503-529
- Alles VV, Botazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A (1994) Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 84:3483-3493
- Almazan G, McKay RDG (1992) An oligodendrocyte precursor cell line from optic nerve. *Brain Res* 579:234-245
- Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, Silleisen H, Simunovic L, Szarek M, Welch MB, Zivin JA (2006) High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med* 355:549-559
- Andela V, Pirri M, Schwarz EM, Puzas EJ, O'Keefe RJ, Rosenblatt JD, Rosier RN (2003) The mevalonate synthesis pathway as a therapeutic target in cancer. *Clin Orthop Relat Res* 415:59-66
- Antel JP, Miron VE (2008) Central nervous system effects of current and emerging multiple sclerosis-directed immuno-therapies. *Clin Neurol Neurosurg* 110:951-957
- Aprahamian T, Bonegio R, Rizzo J, Perlman H, Lefer DJ, Rifkin IR, Walsh K (2006) Simvastatin treatment ameliorates autoimmune disease associated with accelerated atherosclerosis in a murine lupus model. *J Immunol* 177:3028-3034

- Arnason BG (1983) Relevance of experimental allergic encephalomyelitis to multiple sclerosis. *Neurol Clin* 1:765-782
- Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, Ramires JA, Serrano CV (2004) Atorvastatin reduced proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 177:161-166
- Athirakul K, Kim H-S, Audoly LP, Smithies O, Coffman TM (2001) Deficiency of COX-1 causes natriuresis and enhanced sensitivity to ACE inhibition. *Kidney Int* 60:2324-2329
- Auernhammer CJ, Chesnokova V, Bousquet C, Melmed S (1998) Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of leukaemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrecorticotropin secretion. *Mol Endocrinol* 12:954-961
- Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW (1971) A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:240-243
- Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW (1972) Isolation and properties of a thrombin-sensitive protein of human platelets. *J Biol Chem* 247:2723-2731
- Ballantyne CM, Sligh JE, Dai XY, Beaudet AL (1992) Characterization of the murine ICAM-1 gene. *Genomics* 14:1076-1080
- Banes-Berceli AK, Shaw S, Ma G, Brands M, Eaton CD, Stern DM, Fulton D, Caldwell RW, Marrero MB (2006) Effect of simvastatin on high glucose- and angiotensin II-induced activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F116-F121
- Bansemer S, Scheel T, Glass A, Koaropka T (2003) gEn0M-software. *Proc Eur Conf Comput Biol* 2:397-398
- Barbacid M (1987) Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779-827
- Bar-On P, Crews L, Koob AO, Mizuno H, Adame A, Spencer B, Masliah E (2008) Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 105:1656-1667
- Barrios CS, Johnson BD, Henderson JJ, Fink JN, Kelly KJ, Kurup VP (2005) The costimulatory molecules CD80, CD86 and OX40L are up-regulated in *Aspergillus fumigatus* sensitized mice. *Clin Exp Immunol* 142:242-250
- Bassa BV, Roh DD, Vaziri ND, Kirschenbaum MA, Kamanna VS (1999) Effect of inhibition of cholesterol synthetic pathway on the activation of Ras and MAP kinase in mesangial cells. *Bioch Bioph Acta* 1449:137-149
- Bauer AK, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM (2000) High cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) contents in mouse lung tumors. *Carcinogenesis* 21:543-550
- Bellosta S, Ferri N, Bernini, Paoletti R, Corsini A (2000) Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 32:164-176
- Ben-Hur T (2008) Immunomodulation by neural stem cells. *J Neurol Sci* 265:102-104
- Berberich I, Shu GL, Clark EA (1994) Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 153:4357-4366
- Bernini F, Poli A, Paoletti R (2001) Safety of HMG-CoA reductase inhibitors: focus on atorvastatin. *Cardiovasc Drugs Ther* 15:211-218
- Bernsen MR, Hakansson L, Gustafsson B, Krysanter L, Rettrup B, Ruiter D, Hakansson A (2003) On the biological relevance of MHC class II and B7 expression by tumor cells in melanoma metastases. *Br J Cancer* 88:424-431

- Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK (2003) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197:1073-1081
- Bevelacqua V, Libra M, Mazzarino MC, Gangemi P, Nicotra G, Curatolo S, Massimino D, Plumari A, Merito P, Valente G, Stivala F, La Greca S, Malaponte G (2006) Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients. *Int J Mol Med* 18:415-423
- Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CGM (2001) Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systematic lupus erythematosus. *Ann Rheum* 60:523-526
- Billiau A, Matthys P (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leuc Biol* 70:849-860
- Birnbaum Y, Lin Y, Ye Y, Martinez JD, Huang MH, Lui CY, Perez-Polo JR, Uretsky BF (2007) Aspirin before reperfusion blunts the infarct size limiting effect of atorvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:2891-2897
- Blakemore WF (2008) Regeneration and repair in multiple sclerosis: the view of experimental pathology. *J Neurol Sci* 265:1-4
- Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, de Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, Leiter LA, Langer A, Martineau P, Egidio J (2007) Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment. Atorvastatin on inflammatory markers study: a substudy of achieve cholesterol targets fast with atorvastatin stratified titration. *Am Heart J* 153:881-888
- Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Pascual A, Plaza JJ, Egidio J (2002) 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 161:17-26
- Blank C, Brown I, Kacha AK, Markiewicz MA, Gajewski TF (2005) ICAM-1 contributes to but is not essential for tumor antigen cross-priming and CD8⁺ T cell-mediated tumor rejection in vivo. *J Immunol* 174:3416-3420
- Boehme M, Kaehne F, Kuehne A, Bernhard W, Schröder M, Pommer W, Fischer C, Becker H, Müller C, Schindler R (2007) Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 22:2224-2229
- Boerma M, Burton GR, Wang J, Fink LM, McGrehee RE, Hauer-Jensen M (2006) Comparative expression profiling in primary and immortalized endothelial cells: changes in gene expression in response to hydroxyl methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibition. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17:173-180
- Bonnefoy A, Moura R, Hoylaerts MF (2008) The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology. *Cell Mol Life Sci* 65:713-727
- Bornstein P, Devarayalu S, Edelhoff S, Disteché CM (1993) Isolation and characterization of the mouse thrombospondin 3 (Thbs 3) gene. *Genomics* 15:607-613
- Bornstein P, Devarayalu S, Li P (1991) A second thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to thrombospondin-1 but does not respond to serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8636-8640
- Bosca F, Coret F, Valero C, Pascual AM, Magraner MJ, Landete L, Casanova B (2008) Effect of relapses over early progression of disability in multiple sclerosis patients treated with beta-interferon. *Mult Scler* 14:636-639
- Bösel J, Endres M (2006) Direkte neuronale Effekte von Statinen. *Nervenarzt* 77:289-290, 292-293

- Botazzi B, Bastone A, Doni A, Garlanda C, Valentino S, Deban L, Maina V, Cotena A, Moalli F, Vago L, Salustri A, Romani L, Mantovani A (2006) The long pentraxin PTX3 is a link among innate immunity, inflammation, and female fertility. *J Leukoc Biol* 79:909-912
- Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Sireafico F, Pausa M, D'Ettorre C, Gianazza E, Tagliabue A, Salmona M, Tedesco F, Introna M, Mantovani A (1997) Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3: similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 272:32817-32823
- Böttcher T, Mix E, Koczan D, Bauer P, Pahnke J, Peters S, Weinelt S, Knoblich R, Strauss U, Cattaneo E, Thiesen H-J, Rölfs A (2003) Gene expression profiling of ciliary neurotrophic factor-overexpressing rat striatal progenitor cells (ST14A) indicates improved stress response during the early stage of differentiation. *J Neurosci Res* 73:42-53
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349:117-127
- Bowman T, Gaesia R, Turkson J, Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19:2474-2488
- Boyd AW, Wawryk SO, Burns GF, Fecondo JV (1988) Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3095-3099
- Boylan MT, Crockard AD, McDonnell GV, Armstrong MA, Hawkins SA (1999) CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) expression in multiple sclerosis patients: clinical subtype specific variation in peripheral monocytes and B cells and lack of modulation by high dose methylprednisolone. *J Neurol Sci* 167:79-89
- Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M, Valle GD, Dejana E, Mantovani A, Introna M (1992) Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells: cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 267:22190-22197
- Brinkkoetter PT, Gottman U, Schulte J, van der Woude FJ, Braun C, Yard BA (2006) Atorvastatin interferes with activation of human CD4(+) T cells via inhibition of small guanosine triphosphase (GTPase) activity and caspase-independent apoptosis. *Clin Exp Immunol* 146:524-532
- Brocke S, Quigley L, McFarland HF, Steinman L (1996) Isolation and characterisation of autoreactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis of the mouse. *Methods* 9:458-462
- Brown AM, McFarlin DE (1981) Relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse. *Lab Invest* 45:278-284
- Bullard DC, Hu X, Schoeb TR, Collins RG, Beaudet AL, Barnum SR (2007) Intercellular adhesion molecule-1 expression is required on multiple cell types for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178:851-857
- Burbach JPH, Smits S, Smidt MP (2003) Transcription factors in the development of midbrain dopamine neurons. *Ann N Y Acad Sci* 991:61-68
- Bussolati B, Peri G, Salvidio G, Verzola D, Mantovani A, Camussi G (2003) The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis and activates mesangial cells. *J Immunol* 170:1466-1472
- Campbell IL, Cutri A, Wilkinson D, Boyd AW, Harrison LC (1989) Intercellular adhesion molecule 1 is induced on isolated endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4282-4286

- Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, Argast GM, Heinrich PC, Fausto N (2001) A new player in the team: SOCS-3 socks it to cytokine signalling in the regenerating liver. *J Clin Invest* 107:1285-1292
- Campbell MJ, Esserman LJ, Zhou Y, Shoemaker M, Lobo M, Borman E, Baehner F, Kumar AS, Adduci K, Marx C, Petricoin EF, Liotta LA, Winters M, Benz S, Benz CC (2006) Breast cancer growth prevention by statins. *Cancer Res* 66:8707-8714
- Candelario-Jalil E, Fieblich BL (2008) Cyclooxygenase inhibition in ischemic brain injury. *Curr Pharm Des* 14:1401-1418
- Cannella B, Cross AH, Raine CS (1991) Adhesion-related molecules in the central nervous system: up-regulation correlates with inflammatory cell influx during relapsing experimental autoimmune encephalitis. *Lab Invest* 65:23-31
- Cao F, Hata R, Zhu P, Ma Y-J, Tanaka J, Hanakawa Y, Hashimoto K, Niinobe M, Yoshikawa K, Sakanaka M (2006) Overexpression of SOCS3 inhibits astrogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. *J Neurochem* 98:459-470
- Carmichael ST (2003) Gene expression changes after focal stroke, traumatic brain and spinal cord injuries. *Curr Opin Neurol* 16:699-704
- Casey PJ, Seabra MC (1996) Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 271:5289-5292
- Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriquez FJ, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J, Arenas A (2003) Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12747-12752
- Cattaneo E, Conti L (1998) Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J Neurosci Res* 53:223-234
- Cattaneo E, De-Fraja C, Conti L, Reinach B, Bolis L, Govoni S, Liboi E (1996) Activation of the Jak/STAT pathway leads to proliferation of ST14A central nervous system progenitor cells. *JBC* 271:23374-23379
- Cattaneo E, Magrassi L, Butti G, Santi L, Giavazzi A, Pezzotta S (1994) A short term analysis of the behaviour of conditionally immortalized neuronal progenitors and primari neuroepithelial cells implanted into the fetal rat brain. *Dev Brain Res* 83:197-208
- Cattaneo E, Pelicci (1998) Emerging roles for SH₂/PTB- containing Shc adaptor proteins in the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 21:476-481
- Cavallin MA, McCluskey P (2007) Upregulation of intracellular adhesion molecule (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) after unilateral nerve injury in the peripheral taste system. *J Neurosci Res* 85:364-372
- Cazorla P, Smidt MP, O'Malley KL, Burbach PH (2000) A response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. *J Neurochem* 74:1829-1837
- Cerezo-Guisado MI, Garcia-Marin LJ, Lorenzo MJ, Bragado MJ (2005) Lovastatin inhibits the growth and survival pathway of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B in Immortalized rat brain neuroblasts. *J Neurochem* 94:1277-1287
- Cervello M, Montalto G (2006) Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 12:5113-5121
- Chan KKW, Oza AM, Siu LL (2003) The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res* 9: 10-19

- Chang T, Jabs C, Sobel RA, Kuchroo VK, Sharpe AH (1999) Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 190:733-740
- Chatila K, Ren G, Xia Y, Huebener P, Bujak M, Frangogiannis NG (2007) The role of the thrombospondins in healing myocardial infarcts. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 5:21-27
- Chello M, Carassiti M, Agro F, Mastroroberto P, Pugliese G, Colonna D, Covino E (2004) Simvastatin blunts the increase of circulating adhesion molecules after coronary artery bypass surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Anesth* 18:605-609
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M (2003) Statins induce angiogenesis, neurogenesis and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 53:743-751
- Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C (2008) Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin* 40:577-594
- Chen X-Q, Yang J, Hu S-P, Nie H-X, Mao G-Y, Chen H-B (2006) Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic cells from allergic asthmatics and their effects on Th1-and Th2-type cytokine balance. *Respiration* 73:34-40
- Chitnis T, Najafian N, Benou C, Salama AD, Grusby MJ, Sayegh MH, Khoury SJ (2001) Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 108:739-747
- Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R (2000) Genetic distribution of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduced intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer* 60:4705-4708
- Ciocca DR, Rozados VR, Cuello Carrion FD, Gervasoni SI, Scharovsky OG (2003) HSP25 and HSP70 in rodent tumors treated with doxorubicin and lovastatin. *Cell Stress Chaperones* 8:26-36
- Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Zucchelli M, Pini B, De Cesare D, Uchino S, Spigonardo F, Bajocchi G, Bei R, Muraro R, Artese L, Piattelli A, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A (2003) Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilisation in humans. *Circulation* 107:1479-1485
- Clezardin P, Malaval L, Ehrensperger AS, Delmas PD, Dechavanne M, McGregor JL (1988) Complex formation of human thrombospondin with osteonectin. *Eur J Biochem* 175:275-284
- Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R; Heart Protection Study Collaborative Group (2004) Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet* 363:757-767
- Collisson EA, Kleer C, Wu M, De A, Gambhir SS, Merajver SD, Kolodney MS (2003) Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2:941-948
- Conti L, Reitano E, Cattaneo E (2006) Neural stem cell systems: diversities and properties after transplantation in animal models of disease. *Brain Pathol* 16:143-154
- Corsini A, Mazzotti M, Raiteri M, Soma MR, Gabbiani G, Fumagalli R, Paoletti R (1993) Relationship between mevalonate pathway and arterial myocyte proliferation: in vitro studies with inhibitors of HMG-CoA reductase. *Atherosclerosis* 101:117-125
- Corti O, Horellou P, Colin P, Cattaneo E, Mallet J (1996) Intracerebral tetracycline-dependent regulation of gene expression in grafts of neural precursor. *Neuroreport* 7:1655-1659

- Crisby M (2006) The role of pleiotrophic effects of statins in dementia. *Acta Neurol Scand* 114:115-118
- Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Shin ML, Rus H (2006) Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *JRRD* 43:123-132
- Cursiefen S, Mäurer M (2008) Current use of immunoglobulins in neurology. *Nervenarzt* (in print)
- Danesch FR, Sadeghi MM, Amro N, Philips C, Zeng L, Lin S, Sahai A, Kanwar YS (2002) 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coa reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/p21 signaling pathway: implications for diabetic neuropathy. *PNAS* 99:8301-8305
- Davignon J, Leiter LA (2007) Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins. *Vasc Health Risk Manag* 1:29-40
- Dedrick RL, Bodary S, Garovoy MR (2003) Adhesion molecules as therapeutic targets for autoimmune disease and transplant rejection. *Expert Opin Biol Ther* 3:85-95
- Deininger MH, Schluesener HJ (1999) Cyclooxygenase-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. *J Neuroimmunol* 95:202-208
- Delgado S, Sheremata WA (2006) The role of CD4+ T-cells in the development of MS. *Neurol Res* 28:245-249
- Deng P, Zhao SP, Dai HY, Guan XS, Huang HG (2006) Atorvastatin reduces the expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from patients with acute myocardial infarction and modulates the early inflammatory response. *Clin Chem* 52:300-303
- Denoyelle C, Albanese P, Uzan G, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C (2003) Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells. *Cell Signal* 15:327-338
- Denoyelle C, Vasse M, Körner M, Mishal Z, Ganne F, Vannier J-P, Soria J, Soria C (2001) Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis* 22: 1139-1148
- Derfuss T, Gurkov R, Then BF, Hartmann M, Barz C, Wilske B, Autenrieth I, Wick M, Hohlfeld R, Meinl E (2001) Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain* 124:1325-1335
- Dezawa M (2008) Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative diseases. *Med Mol Morphol* 41:14-19
- Dixit VM, Grant GA, Santoro SA, Frazier WA (1984) Isolation and characterization of a heparin-binding domain from the amino terminus of platelet thrombospondin. *J Biol Chem* 259:10100-10105
- Doni A, Peri G, Chieppa M, Allavena P, Pasqualini F, Vago L, Romani L, Garlanda C, Mantovani A (2003) Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 33:2886-2893
- Dulak J, Loboda A, Jazwa A, Zagorska A, Dörler J, Alber H, Dichtl W, Weidinger F, Frick M, Jozkowicz A (2005) Atorvastatin affects several angiogenic mediators in human endothelial cells. *Endothelium* 12:233-241
- Duncan ID (2008) Replacing cells in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 265:89-92
- Duncan ID, Goldman S, Macklin WB, Rao M, Weiner LP, Reingold SC (2008) Stem cell therapy in multiple sclerosis: promise and controversy. *Multiple Sclerosis* 14:541-546

- Dunn SE, Youssef S, Goldstein MJ, Prod'homme T, Weber MS, Zamvil SS, Steinman L (2006) Isoprenoids determine Th1/Th2 fate in pathogenic T cells, providing a mechanism of modulation of autoimmunity by atorvastatin. *J Exp Med* 203:401-412
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA (1986) Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137:245-254
- Duval D, Reinhardt B, Kedinger C, Boeuf H (2000) Role of suppressors of cytokine signalling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J* 14:1577-1584
- Ehrlich ME, Conti L, Toselli M, Taglietti L, Fiorillo E, Taglietti V, Ivkovic S, Guinea B, Tranberg A, Sipione S, Rigamonti D, Cattaneo E (2001) ST14A cells have properties of a medium-size spiny neuron. *Exp Neurol* 167:215-226
- Einstein O, Ben-Hur T (2008) The changing face of neural stem cell therapy in neurologic disease. *Arch Neurol* 65:452-456
- Einstein O, Fainstein N, Vaknin I, Mizrachi-Kol R, Reinhartz E, Grigoriadis N, Lavon I, Baniyash M, Lassmann H, Ben-Hur T (2007) Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. *Ann Neurol* 61:209-218
- Einstein O, Grigoriadis N, Mizrachi-Kol R, Reinhartz E, Polyzoidou E, Lavon I, Milonas I, Karussis D, Abramsky O, Ben-Hur T (2006) Transplanted neural precursor cells reduce brain inflammation to attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol* 198:275-284
- Einstein O, Karussis D, Grigoriadis N, Mizrachi-Kol R, Reinhartz E, Abramsky O, Ben-Hur T (2003) Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci* 24:1074-1082
- Ellmerich S, Mycko M, Takacs K, Waldner H, Wahid FN, Boyton RJ, King RH, Smith PA, Amor S, Herlihy AH, Hewitt RE, Jutton M, Price DA, Hafler DA, Kuchroo VK, Altmann DM (2005) High incidence of spontaneous disease in an HLA-DR 15 and TCR transgenic multiple sclerosis model. *J Immunol* 174:1938-1946
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E (2001) SOCS-3 inhibit insulin signalling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 276:47944-47949
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton DJ, Van Obberghen E (2000) SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signalling. *J Biol Chem* 275:15985-15991
- Emery B, Cate HS, Marriott M, Merson T, Binder MD, Snell C, Soo PY, Murray S, Croker B, Zhang J-G, Alexander WS, Cooper H, Blutzkeven H, Kilpatrick TJ (2006) Suppressor of cytokine signalling 3 limits protection of leukaemia inhibitory factor receptor signalling against central demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7859-7864
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8880-8885
- Esiri MM, Gay D (1997) The immunocytochemistry of multiple sclerosis plaques. In *Multiple Sclerosis: Clinical and Pathogenetic Basis*. C.S. Raine, H.F. McFarland, and WW Tourtellotte, editors. Chapman and Hall Medical, London. pp. 173-186

- Falke P, Mattiasson I, Stavenow L, Hood B (1989) Effects of a competitive inhibitor (mevinolin) of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on human and bovine endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells in vitro. *Pharmacol Toxicol* 64:173-176
- Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R (2004) Insulin resistance-inducing cytokines differentially regulate SOCS mRNA expression via growth factor- and Jak/Stat-signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 181:129-138
- Favatier F, Bornman L, Hightower LE, Gunther E, Polla BS (1997) Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphisms: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress Chaperones* 2:141-155
- Fazzini F, Peri G, Doni A, Dell'Antonio G, Dal Cin E, Bozzolo E, D'Auria F, Praderio L, Ciboddo G, Sabbadini MG, Manfredi AA, Mantovani A, Querini PR (2001) PTX3 in small vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. *Arthritis Rheum* 44:2841-2850
- Feldman M, Steinman L (2005) Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature* 435:612-619
- Fenton JW, Jeske WP, Catalfamo JL, Brezniak DV, Moon DG, Shen GX (2002) Statin drugs and dietary isoprenoids downregulate protein prenylation in signal transduction and are antithrombotic and prothrombolytic agents. *Biochemistry (Moscow)* 67:85-91
- Ferraro A, Jervis GA (1940) Experimental disseminated encephalopathy in the monkey. *Arch Neurol and Psych* 43:195-209
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl J Med* 285:1182-1186
- Frangogiannis NG, Guofeng R, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, Winkelmann K, Michael LH, Lawler J, Entman ML (2005) Critical role of endogenous Thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation* 111:2935-2942
- Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay RDG (1988) Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1:439-448
- Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng ZW, Restivo VA Jr, Lombard LA, Gray GS, Nadler LM (1993) Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262:909-911
- Freund J, Bonato MV (1944) The effect of paraffin oil, lanolin-like substances and killed tubercle bacilli on immunization with diphteritic toxoid and *Bact. Typhosum*. *J Immunol* 57:179
- Freund J, Stern ER, Pisani TM (1947) Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J Immunol* 57:179-194
- Frijns CJM, Kapelle LJ (2002) Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 33:2115-2122
- Fritz G (2005) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as anticancer drugs (review). *Int J Oncol* 27:1401-1409
- Fritz G, Kaina B (2006) Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 6:1-14
- Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 5:2304-2312
- Fuse S, Obar JJ, Bellfy S, Leung EK, Zhang W, Usherwood EJ (2006) Cd80 and Cd86 control antiviral Cd8+ T-cell function and immune surveillance of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 80:9159-9170

- Gallo V, Armstrong RC (2008) Myelin repair strategies: a cellular view. *Curr Opin Neurol* 21:278-283
- Garcia-Roman N, Alvarez AM, Toro MJ (2001) Lovastatin induced apoptosis of spontaneously immortalized rat brain neuroblasts: involvement of nonsterol isoprenoid biosynthesis inhibition. *Molec Cell Neurosci* 17:329-341
- Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A (2005) Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition and female fertility. *Annu Rev Immunol* 23:337-366
- Garlanda C, Bottazzi B, Salvatori G, De Santis R, Cotena A, Deban L, Maina V, Moalli F, Doni A, Veliz-Rodriguez T, Mantovani A (2006) Pentraxins in innate immunity and inflammation. *Novartis Found Symp* 279:80-86
- Ghittoni R, Napolitani G, Benati D, Uliveri C, Patrussi L, Pasini FL, Lanzavecchia A, Baldari CT (2006) Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases. *Eur J Immunol* 36:2885-2893
- Ghittoni R, Patrussi L, Pirozzi K, Pellegrini M, Lazzerini PE, Cappecchi PL, Pasini FL, Baldari CT (2005) Simvastatin inhibits activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *FASEB J* 19:605-607
- Giguere J-F, Tremblay MJ (2004) Statin compounds reduce human immunodeficiency virus Type1 replication by preventing the interaction between virion-associated host intercellular adhesion molecule 1 and its natural cell surface ligand LFA-1. *J Virol* 78:12062-12065
- Gingrich JC, Davis DR, Nguyen Q (2000) Multiplex detection and quantitation of proteins on Western blots using fluorescent probes. *Biotechniques* 29:636-642
- Ginsberg HN (1998) Effects of statins on triglyceride metabolism. *Am J Cardiol* 81:B32-B35
- Glass A, Gierl L (2002) A system architecture for demonic data analysis. *In Silico Biol* 2:207-211
- Goertsches R, Comabella M, Navarro A, Perkal H, Montalban X (2005) Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 164:140-147
- Gold R, Brück W (2007) Fortschritte in der Pathogeneseforschung der Multiple Sklerose. *Nervenheilkunde* 26:572-577
- Gold R, Heidenreich F, Kappos L (2001) Immunotherapy of multiple sclerosis with glatiramer acetate mechanisms of action and results from therapeutic trials. *Akt Neurol* 29:345-351
- Gold R, Stadelmann C, Linker R, Diem R, Bähr M, Brück W (2005) Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der Multiplen Sklerose. *Deutscher Ärzteblatt* 17:950-956
- Goldman F, Hohl RJ, Crabtree J, Lewis-Tibesara K, Koretzky G (1996) Lovastatin inhibits T-cell antigen receptor signalling independent of its effects on ras. *Blood* 88:4611-4619
- Goldman SA, Windrem MS (2006) Cell replacement therapy in neurological disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1463-1475
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430
- Gonsette RE (1996) Mitoxantrone immunotherapy in multiple sclerosis. *Mult Scler* 6:329-332
- Gonzalez-Diez M, Rodriguez C, Badimon L, Martinez-Gonzalez J (2008) Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin. *Thromb Haemost* 100:119-126
- Goodman AR, Levy DE, Reis LF, Vilcek J (2000) Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 67:387-395

- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1-49
- Greenwood J, Walters CE, Pryce G, Kanuga N, Beraud E, Baker D, Adamson P (2003) Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB* 17: 905-907
- Greenwood J, Wang Y, Calder VL (1995) Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunol* 86:408-415
- Grunler J, Ericsson J, Dallner G (1994) Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1212:259-277
- Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Qlonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J (1998) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 83:490-500
- Gundersen HJ, Jensen EB (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147:229-263
- Habib A, Shamseddeen I, Nasrallah MS, Antoun TA, Nemer G, Bertoglio J, Badreddine R, Badr KF (2007) Modulation of COX-2 expression by statins in human monocytic cells. *FASEB J* 21:1665-1674
- Haddock G, Cross AK, Plumb J, Surr J, Buttle DJ, Bunning RA, Woodroffe MN (2006) Expression of ADAMTS-1, -4, -5 and TIMP-3 in normal and multiple sclerosis CNS white matter. *Mult Scler* 12:386-396
- Han B, Mura M, Andrade CF, Okutani D, Lodyga M, dos Santos CC, Keshavjee S, Matthay M, Liu M (2005) TNF α -induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J Immun* 175:8303-8311
- Hänninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O (1992) Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J Clin Invest* 90:1901-1910
- Hara K, Yasuhara T, Maki M, Matsukawa N, Masuda T, Yu SJ, Ali M, Yu G, Xu L, Kim SU, Hess DC, Borlongan CV (2008) Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke. *Prog Neurobiol* 85:318-334
- Hartlage-Rübsamen M, Schliebs R (2001) Sequential upregulation of cell adhesion molecules in degenerating rat basal forebrain cholinergic neurons and in phagocytotic microglia cells. *Brain Res* 897:20-26
- Hartman T (2001) Cholesterol, A beta and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 24:45-48
- Hartung HP, Michels M, Reiners K, Selldrayers P, Archelos JJ, Toyka KV (1993) Soluble ICAM-1 serum levels in multiple sclerosis and viral encephalitis. *Neurology* 43:2331-2335
- Hatayama T, Honda K, Yukioka M (1986) HeLa cells synthesize a specific heat shock protein upon exposure to heat shock at 42°C but not at 45°C. *Biochem Biophys Res Commun* 137:957-963
- Hatayama T, Takigawa T, Takeuchi S, Shiota K (1997) Characteristic expression of high molecular mass heat shock protein HSP105 during embryo development. *Cell Struct Funct* 22:517-525
- Hatayama T, Yamagishi N, Minobe E, Sakai K (2001) Role of Hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal Pc12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288:528-534
- Hatayama T, Yasuda K, Nishiyama E (1994) Characterization of high-molecular-mass heat shock proteins and 42 degree C-specific heat shock proteins of murine cells. *Biochim Biophys Res Commun* 204:357-365

- Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL (1986) Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 19:578-587
- Hayes A, Scese T, Miller J, Murphy S, Sparkes A, Adams V (2006) COX-1 and COX-2 expression in feline oral squamous cell carcinoma. *J Comp Pathol* 135:93-99
- He X, Han B, Liu M (2007) Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L1039-1049
- He X, Jenner AM, Ong WY, Farooqui AA, Patel SC (2006) Lovastatin modulates increased cholesterol and oxysterol levels and has a neuroprotective effect on rat hippocampal neurons after kainate injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:652-663
- Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3:291-301
- Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, Gomez-Hernandez A, Tunon J, Hernandez-Vargas P, Blanco-Colio LM, Mas S, Aparico C, Ortega L, Vivanco F, Gerique JG, Diaz C, Hernandez G, Egido J (2002) Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 160:49-58
- Hernández-Romero MC, Argüelles S, Villarán RF, Pablos RM, Delgado-Cortés MJ, Santiago M, Herrera AJ, Cano J, Machado A (2008) Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. *J Neurochem* 105:445-459
- Hoffrogge R, Beyer S, Hübner R, Mikkat S, Mix E, Scharf Ch, Schmitz U, Pauleweit S, Berth M, Zubrzycki IZ, Christoph H, Pahnke J, Wolkenhauer O, Uhrmacher A, Völker U, Rolfs A (2007) 2-DE profiling of GDNF overexpression-related proteome changes in differentiating ST14A rat progenitor cells. *Proteomics* 7:33-46
- Hofmann N, Lachnit N, Streppel M, Witter B, Neiss WF, Guntinas-Lichius O, Angelov DN (2002) Increased expression of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 and MIP-1 α by spinal perivascular macrophages during experimental allergic encephalomyelitis in rats. *BMC Immunol* 3:1-13
- Holstein SA, Wohlford-Lenane ChL, Hohl RJ (2002) Consequences of mevalonate depletion. *J Biol Chem* 277:10678-10682
- Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, Kiryu J, Honda Y, Yue BY, Sawamura T (2002) Statin inhibits leucocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 120:1707-1713
- Hoozemans JJ, Rozenmuller AJ, Janssen I, De Groot CJ, Veerhuis R, Eikelenboom P (2001) Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol* 101:2-8
- Hoque A, Chen H, Xu XC (2008) Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:88-94
- Horley KJ, Carpenito C, Baker B, Takei F (1989) Molecular cloning of murine intercellular adhesion molecule (ICAM-1). *EMBO J* 8:2889-2896
- Hosaka S, Nakatsura T, Tsukamoto H, Hatayama T, Baba H, Nishimura Y (2006) Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induced apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 97:623-632
- Hsu Y-C, Lee D-C, Chiu I-M (2007) Neural stem cells, neural progenitors and neurotrophic factors, *Cell Transplant* 16: 133-150

- Huang K-C, Chen C-W, Chen J-C, Lin W-W (2003) Statins induce suppression of cytokine signalling-3 in macrophages. *FEBS Letters* 555: 385-389
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E (1998) Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:455-460
- Ibrahim SM, Mix E, Böttcher T, Koczan D, Gold R, Rolfs A, Thiesen H-J (2001) Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124:1927-1938
- Iezzi A, Ferri C, Mezzetti A, Cipollone F (2007) COX-2: friend or foe? *Curr Pharm Des* 13:1715-1721
- Ihle JN (2001) The Stat family in cytokine signalling. *Curr Opin Cell Biol* 13:211-217
- Iniguez MA, Pablos JL, Carreira PE, Cabre F, Gomez-Reino (1998) Detection of COX-1 and COX-2 isoforms in synovial fluid cells from inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* 37:773-778
- Inoue K, Sugiyama A, Reid PC, Ito Y, Miyauchi K, Sagara M, Miyamoto K, Satoh H, Isao K, Mantovani A, Hamakubo T, Daida H, Kodama T (2007) Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 for unstable angina pectoris. *Ater Thromb Vascular Biol* 27:161-167
- Introna M, Vidal Alles V, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzai B, Peri G, Breviario F, Salmona M, De Gregorio L, Dragani TA, Srinivasan N, Blundell TL, Hamilton TA, Mantovani A (1996). Cloning of mouse PTX3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood* 87:1862-1872
- Isenberg JS, Romeo MJ, Yu C, Yu CK, Nghiem K, Monsale J, Rick ME, Wink DA, Frazier WA, Roberts DD (2008) Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the anti-thrombotic activity of nitric oxide/cGMP signalling. *Blood* 111:613-623
- Ishihara K, Yamagishi N, Hatayama T (2003) Protein kinase CK2 phosphorylates Hsp105 α at Ser⁵⁰⁹ and modulates its function. *Biochem J* 371:917-925
- Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, Takasaki M, Konoshima T, Hatayama T (2006) Arctigenin from *fructis arctii* is a novel suppressor of heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones* 11:154-161
- Ishihara K, Yasuda K, Hatayama T (1999) Molecular cloning and location of human 105 kDa heat shock protein, hsp105. *Biochem Biophys Acta* 1444: 138-142
- Ishikawa M, Namiki A, Kubota T, Yajima S, Fukazawa M, Moroi M, Sugi K (2006) Effect of pravastatin and atorvastatin on glucose metabolism in non-diabetic patients with hypercholesterolemia. *Intern Med* 45:51-55
- Istvan ES, Deisenhofer J (2001) Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292:1160-1164
- Ivashkiv LB, Tassioulas I (2003) Can SOCS make arthritis better? *J Clin Invest* 111:795-797
- Jackson SH, Cheng-Rong Yu, Mahdi RM, Ebong S, Egwuagu CE (2004) Dendritic cell maturation requires STAT1 is under feedback regulation by suppressors of cytokine signalling. *J Immunol* 172:2307-2315
- Jaffe EA, Ruggiero JT, Falcone DJ (1985) Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood* 65:79-84
- Jaffe EA, Ruggiero JT, Leung LK, McKeown-Longo PJ, Mosher DF (1983) Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:998-1002
- Jakobisiak M, Golab J (2003) Potential antitumor effects of statins. *Int J Oncol* 23:1055-1069

- Jenkins LM, Mazur SJ, Rossi M, Gaidarenko O, Xu Y, Appella E (2008) Quantitative proteomics analysis of the effects of ionizing radiation in wild type and p53 K31R knock-in mouse thymocytes. *Mol Cell Proteomics* 7:716-727
- Jiang JL, Wang S, Li NS, Zhang XH, Deng HW, Li YJ (2007) The inhibitory effect of simvastatin on the ADMA-induced inflammatory reaction in mediated by MAPK pathways in endothelial cells. *Biochem Cell Biol* 85:66-77
- Jones KD, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, Law RE (1994) Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1681-1687
- Kai M, Nakatsura T, Egami H, Senju S, Nishimura Y, Ogawa M (2003) Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep* 10:1777-1782
- Kallen J, Welzenbach K, Ramage P, et al. (1999) Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain. *J Mol Biol* 292:1-9
- Kaplan M, Olschowka JA, O'Banion MK (1997) Cyclooxygenase-1 behaves as a delayed response gene in PC12 cells differentiated by nerve growth factor. *J Biol Chem* 272:18534-18537
- Karandikar N, Vanderlugt C, Eagar T, Tan L, Bluestone J (1998) Tissue-species up-regulation of B7-1 expression and function during the course of murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 161:192-199
- Karussis D, Grigoriadis S, Polyzoidou E, Grigoriadis N, Slavin S, Abramsky O (2006) Neuroprotection in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 108:250-254
- Karussis D, Kassir I (2007) Use of stem cells for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 7:1189-1201
- Karussis D, Kassir I, Kurkalli BG, Slavin S (2008) Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative disease. *J Neurol Sci* 265:131-135
- Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF (1997) Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 54:601-624
- Kawaji T, Inomata Y, Takano A, Sagara N, Inatani M, Fukushima M, Tanihara H, Honjo M (2007) Pitavastatin: protection against neuronal retinal damage induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *Curr Eye Res* 32:991-997
- Kazerounian S, Yee O, Lawler J (2008) Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Sci* 65:700-712
- Khanzada UK, Pardo OE, Meier C, Downward J, Seckl MJ, Arcaro A (2006) Potent inhibition of small-cell lung cancer cell growth by simvastatin reveals selective functions of Ras isoforms in growth factor signalling. *Oncogene* 25:877-887
- Khoury SJ, Akalin E, Chandraker A, Turka LA, Linsley PS, Sayegh MH, Hancock WW (1995) CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* 155:4521-4524
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50-56

- Kim SU (2007) Genetically engineered human neural stem cells for brain repair in neurological diseases. *Brain Dev* 29:193-201
- Kim YS, Ahn Y, Hong MH, Kim KH, Park HW, Hong YJ, Kim W, Jeong MH, Cho JG, Park JC, Kang JC (2007) Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-Jun N-terminal kinase Nuclear Factor-kappaB in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 49:376-383
- Kimura K, Kosuge M, Ishikawa T, Shimizu M, Endo T, Hongo Y, Tochikubo O, Umemura S (2001) Relationship between myocardial damage and C-reactive protein levels immediately after onset of acute myocardial infarction. *Jpn Circ J* 65:67-70
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285:1-24
- Kivipelto M, Solomon A, Winblad B (2006) Alzheimer's Disease: back to the future. *Acta Neurol Scand* 114:119-120
- Kleinschnitz C, Meuth SG, Kieseier BC, Wiendl H (2007) Multiple-Sklerose-Update zur Pathophysiologie und zu neuen immuntherapeutischen Ansätzen. *Nervenarzt* 78:883-911
- Klouche M, Brockmeyer N, Knabbe C, Rose-John S (2002) Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induced PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells. *AIDS* 16:F9-18
- Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, Schmitz G, Mantovani A (2004) Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 175:221-228
- Kobashigawa JA, Karznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM, Chia D, Terasaki PI, Sabad A, Cogert GA (1995) Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 333:621-627
- Kohriyama T, Ochi K, Matsumoto M (2008) Interferon-beta treatment for multiple sclerosis and predictors of response. *Nippon Rinsho* 66:1119-1126
- Kolb-Bachofen V (1991) A review on the biological properties of C-reactive protein. *Immunology* 183:133-145
- Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitmann MA, Bynum L (2000) Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55:565-569
- Konstantinopolus PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG (2007) Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nature Rev* 6:541-555
- Konturek PC, Burnat G, Hahn EG (2007) Inhibition of Barrett's adenocarcinoma cell growth by simvastatin: involvement of COX-2 and apoptosis-related proteins. *J Physiol Pharmacol* 58:141-148
- Koritschoner RS, Schweinburg F (1925) Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitäts Exp Therapie* 42:217-283
- Koytchev R, Ozalp Y, Erenmemisoglu A, van der Meer MJ, Alpan RS (2004) Bioequivalence study of atorvastatin tablets. *Arzt Mittelforschung*. 54:573-577
- Kretz A, Schmeer C, Tausch S, Isenmann S (2006) Simvastatin promotes heat shock protein 27 expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Neurobiol Dis* 21:421-430

- Kuipers HF, Biesta PJ, Groothuis TA, Neefjes JJ, Mommaas AM, van den Elsen PJ (2005) Statins affect cell-surface expression of major histocompatibility complex class II molecules by disrupting cholesterol-containing microdomains. *Hum Immunol* 66:653-665
- Kunes P (2005) The role of pentraxin 3 in the inflammatory and immune response. *Cas Lek Cesk* 144:377-382
- Kurakata S, Kada M, Shimada Y, Komai T, Nomoto K (1996) Effects of different inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, pravastatin sodium and simvastatin, on sterol synthesis and immunological functions in human lymphocytes in vitro. *Immunopharmacology* 34:51-61
- Kurokohchi K, Masaki T, Himoto T, Deguchi T, Nakai S, Morishita A, Yoneyama H, Kimura Y, Watanabe S, Kuriyama S (2006) Usefulness of liver infiltrating CD86-positive mononuclear cells for diagnosis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 12:2523-2529
- Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444-1452
- Kurtzke JF (2000) Epidemiology of multiple sclerosis. Does this point toward an etiology? *Lectio Doctoralis. Neurol Sci* 21:383-403
- Kuusisto J, Andrulionyte L, Laakso M (2007) Atherosclerosis and cardiovascular risk reduction with PPAR agonists. *Curr Atheroscler Rep* 9:274-280
- Kwak B, Mulhaupt F, Mach F (2000) Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nature Med* 6:399-402
- LaBell TL, Milewicz DJ, Distech CM, Byers PH (1992) Thrombospondin II: partial cDNA sequence, chromosome location, and expression of a second member of the thrombospondin gene family in humans. *Genomics* 12:421-429
- Lahav J, Lawler J, Gimbrone MA (1984) Thrombospondin interactions with fibronectin and fibrinogen. Mutual inhibition in binding. *Eur J Biochem* 145:151-156
- Laherty CD, O'Rourke K, Wolf F (1992) Characterization of mouse thrombospondin-2 sequence and expression during cell growth and development. *J Biol Chem* 267:24921-24924
- Lange C, Mix E, Rateitschak K, Rolfs A (2006) Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. *Neurodegener Dis* 3:76-86
- Lansberg P (2008) Pleiotropic effects of statins and beyond. *Cardiology* 112:1-3
- LaRosa JC, He J, Vupputuri S (1999) Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 282:2340-2346
- Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC (1994) Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 152:5208-5219
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7:115-121
- Latini R, Maggioni AP, Peri L, Ronzini D, Lucci P, Mocarelli L, Vago F, Pasqualini S, Signorini D, Soldateschi, Tarli L, Schweiger C, Fresco C, Cecere R, Tognoni G, Mantovani A (2004) Prognostic significance of the long pentraxin in acute myocardial infarction. *Circulation* 110:2349-2354
- Laufs U, Liao JK (1998) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273:24266-24271
- Lavdas AA, Papastefanaki F, Thomaïdou D, Matsas R (2008) Schwann cell transplantation for CNS repair. *Curr Med Chem* 15:151-160

- Lawler J (1986) The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood* 67:1197-1209
- Lawler J (2002) Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 6:1-12
- Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, Adams JC, McHenry K, DeSimone DW (1993) Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family. *J Cell Biol* 120: 1059-1067
- Lawler J, Hynes RO (1986) The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol* 103: 1635-1648
- Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE (1978) Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 253:8609-8616
- Lawman S, Mauri C, Jury EC, Cook HT, Ehrenstein MR (2004) Atorvastatin inhibits autoreactive B cell activation and delays lupus development in New Zealand black/white F1 mice. *J Immunol* 173:7641-7646
- Ledeboer A, Wierinckx A, Bol JG, Floris S, Renardel de Lavalette C, De Vries HE, van den Berg TK, Dijkstra CD, Tilders FJ, van Dam AM (2003) Regional and temporal expression patterns of interleukin-10 receptor and adhesion molecules in the rat spinal cord during chronic relapsing EAE. *J Neuroimmunol* 136:94-103
- Lee GW, Lee TH, Vilcek J (1993) TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. *J Immunol* 150:1804-1812
- Lee MH, Cho YS, Han YM (2007) Simvastatin suppresses self-renewal of mouse embryonic stem cells by inhibition RhoA Geranylgeranylation. *Stem Cells* 25:1654-1663
- Lenschow DJ, Sperling AI, Cooke MP, Freeman G, Rhee L, Decker DC, Gray G, Nadler LM, Goodnow CC, Bluestone JA (1994) Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol* 153:1990-1997
- Levine S, Wenk EJ (1965) A hyperacute form of allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol* 47:61-88
- Levy DE, Darnell JE Jr (2002) STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662
- Lewanska M, Siger-Zajdel M, Selmaj K (2002) No difference in efficacy of two different doses of intravenous immunoglobulins in MS: clinical and MRI assessment. *Eur J Neurol* 9:565-572
- Li DZ, Ranjit s, Zeng QT, Tian Y, Feng YB, Wang X, Cao LS (2004) Effects of atorvastatin on the function of dendritic cells in patients with unstable angina pectoris. *Zhonghua Nei Ke Zhi* 43:429-432
- Li G, Zhang XC (2004) GTP hydrolysis mechanism of Ras-like GTPases. *J Mol Biol* 340:921-932
- Liang XD, Shi HZ, Qin XJ, Deng JM (2006) Increase in concentration of soluble CD86 after segmental allergen challenge in patients with allergic asthma. *Chest* 130:1048-1054
- Liao JK (2002) Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest* 110:285-288
- Linker RA, Stadelmann C, Diem R, Bähr M, Brück W, Gold R (2005) Recent advances in pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Fortschr Neurol Psychiatr* 73:715-727
- Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA (1998) Jak/STAT signalling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 10:271-278
- Loboda A, Jazwa A, Jozkowicz A, Molema G, Dular J (2006) Angiogenic transcriptome of human microvascular endothelial cells: effect of hypoxia, modulation by atorvastatin. *Vascular Pharmacol* 44:206-214

- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500-508
- Longo FM, Yang T, Xie Y, Massa SM (2006) Small molecule approaches for promoting neurogenesis. *Curr Alzheimer Res* 3:5-10
- Lu D, Qu C, Goussev A, Jiang H, Lu C, Schallert T, Mahmood A, Chen J, Li Y, Chopp M (2007) Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 24:1132-1146
- Lublin FD, Maurer PH, Berry RG, Tippett D (1981) Delayed, relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Immunol* 126:819-822
- Lublin FD, Reingold SC (1997) Guidelines for clinical trials of new therapeutic agents in multiple sclerosis: relations between study investigators, advisors, and sponsors. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurol* 48:572-574
- Luccarini I, Ballerini C, Biagioli T, Biamonte F, Bellucci A, Rosi MC, Massacesi L, Casamenti F (2008) Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE. *Exp Neurol* 211:214-226
- Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W (2005) The pathology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:77-105
- Luchetti MM, Piccinini G, Mantovani A, Peri G, Matteucci C, Pomponio G, Fratini M, Fraticelli P, Sambo P, Di Loreto C, Doni A, Introna M, Gabrielli A (2000) Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 119:196-202
- Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ (1998) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Mineral Res* 13: 581-589
- Ludwin SK (2000) The neuropathology of multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* 10:625-648
- Maeda A, Sobel R (1996) Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:300-309
- Magalon K, Cantarella C, Monti G, Cayre M, Durbec P (2007) Enriched environment promotes adult neural progenitor cell mobilization in mouse demyelination models. *Eur J Neurosci* 25:761-771
- Malaguarnera L, Pilastro MR, Vicari L, Di Marco R, Malaguarnera M, Messina A (2000) PTX3 gene expression in Castleman's disease. *Eur J Haematol* 64:132-134
- Mandel M, Gurevich M, Pauzner R, Kaminski N, Achiron A (2004) Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 138:164-170
- Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Martinez de la Torre Y, Latini R (2006) The long pentraxin PTX3 in vascular pathology. *Vascular Pharmacol* 45:326-330
- Marine J-C, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nakajima H, Pendeville H, Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle JN (1999) SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* 98:617-627
- Marketou ME, Zacharis EA, Nikitovic D, Ganotakis ES, Parthenakis FI, Maliaraki N, Vardas PE (2006) Early effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress and proinflammatory cytokines in hyperlipidemic subjects. *Angiology* 57:211-218

- Maron DJ, Fazio S, Linton MF (2000) Current perspectives on statins. *Circulation* 101:207-213
- Martin R, McFarlin H (1996) Experimental immunotherapies for multiple sclerosis. *Semin Immunopathol* 18:1-24
- Martin R, McFarlin HF, McFarlin DE (1992) Immunological aspects of demyelinating disease. *Annu Rev Immunol* 10:153-187
- Martinez-Sales V, Vila V, Ferrando M, Reganon E (2007) Atorvastatin neutralized the up-regulation of thrombospondin-1 induced by thrombospondin in human umbilical vein endothelial cells. *Endothelium* 14:233-238
- Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gomez-Hernandez A, Munoz-Garcia B, Vega M, Serrano J, Ortega L, Hernandez G, Tunon J, Egido J (2005) Intensive treatment with atorvastatin reduced inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke* 36:1796-1800
- Maseri A, Biasucci LM, Liuzzo G (1996) Inflammation in ischemic heart disease. *BMJ* 312:1049-1050
- Masuhara M, Sakamoto H, Matsumoto A, Suzuki R, Yasukawa H, Mitsui K, Wakioka T, Tanimura S, Sasaki A, Misawa H, Yokouchi M, Ohtsubo M, Yoshimura A (1997) Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun* 239:439-446
- McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer E (1993) Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 7:84-92
- McGillicuddy FC, O'Toole D, Hickey JA, Gallagher WM, Dawson KA, Keenan AK (2006) TGF-beta1-induced thrombospondin-1 expression through the p38 MAPK pathway is abolished by fluvastatin in human coronary artery smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol* 44:469-475
- Ménager C, Kaibuchi K (2003) Rho proteins: their function in neurons. *Med Sci* 19:358-363
- Menge T, Hartung HP, Stuve O (2005) Statins – a cure-all for the brain? *Nat Rev Neurosci* 6:325-331
- Meske V, Albert F, Richter D, Schwarze J, Ohm TG (2003) Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 17:93-102
- Miao H, Jiang L, Huang L (2005) Effects of simvastatin on the expression of intracellular adhesion molecule-1 mRNA in neonatal brain with hypoxic-ischemic damage. *J Nanosci Nanotechnol* 5:1261-1265
- Miao W-M, Seng WL, Duquette M, Lawler P, Laus C, Lawler J (2001) Thrombospondin-1 Type 1 repeat recombinant proteins inhibit tumor growth through transforming growth factor- β -dependent. *Cancer Res* 61:7830-7839
- Minohara M (2003) Heat shock protein 105 in multiple sclerosis. *Nippon Rinsho* 61:1317-1322
- Miron VE, Rajasekharan S, Jarjour AA, Zamvil SS, Kennedy TE, Antel JP (2007) Simvastatin regulates oligodendroglial process dynamic and survival. *GLIA* 55:130-143
- Misiuta IE, Saporta S, Sanberg Pr, Zigova T, Willing AE (2006) Influence of retinoic acid and lithium on proliferation and dopaminergic potential of human NT2 cells. *J Neurosci Res* 83:668-679
- Mitchell JA, Warner TD (2006) COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nature* 5:75-86
- Mitome M, Low HP, Pol van den A, Nunnari JJ, Wolf MK, Billings-Gagliardi S, Schwartz WJ (2001) Towards the reconstruction of central nervous system white matter using neural precursor cells. *Brain* 124:2147-2161

- Mix E, Ibrahim S, Pahnke J, Koczan D, Sina C, Böttcher T, Thiesen H-J, Rolfs A (2004) Gene-expression profiling of the early stages of MOG-induced EAE proves EAE-resistance as an active process. *J Neuroimmunol* 151:158-170
- Mix E, Ibrahim SM, Pahnke J, Glass Ä, Mazor-Pelaez I, Lemcke S, Koczan D, Gimsa U, Bansemer S, Scheel T, Karopka T, Böttcher T, Müller J, Dazert E, Antipova V, Hoffrogge R, Wree A, Zschiesche M, Strauß U, Kundt G, Warzok R, Gierl L, Rolfs A (2006) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor Atorvastatin mediated effects depend on the activation status of target cells in PLP-EAE. *J Autoimmun* 27:251-265
- Mix E, Pahnke J, Ibrahim SM (2002) Gene-expression profiling of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochem Res* 27:1157-1163
- Miyanaka Y, Ueno Y, Tanaka S, Yoshioka K, Hatakeyama T, Shimamoto M, Sumii M, Chayama K (2007) Clinical significance of mucosal suppressors of cytokine signalling 3 expression in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 13:2939-2944
- Modo M, Beech JS, Meade TJ, Williams SC, Price J (2008) A chronic 1 year assessment MRI contrast agent-labelled neural stem cell transplants in stroke. *Neuroimage* (in print)
- Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, EL-Hafiz HA, McMahon RF (2004) Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrosis. *J Clin Pathol* 57:350-354
- Mohammed SI, Dhawan D, Abraham S, Snyder PW, Waters DJ, Craig BA, Lu M, Wu L, Zheng R, Stewart J, Knapp DW (2006) Cyclooxygenase inhibitors in urinary bladder cancer: in vitro and in vivo effects. *Mol Cancer Ther* 5:329-336
- Molokhia M, McKeigue P, Curcin V, Majeed A (2008) Statin induced myopathy and mialgie: time trend analysis and comparison of risk associated with statin class from 1991-2006. *PLoS ONE* 3:e2522
- Monetti M, Canavesi M, Camera M, Parente R, Paoletti R, Tremoli E, Corsini A, Bellosta S (2007) Rosuvastatin displays anti-atherothrombotic and antiinflammatory properties in apoE-deficient mice. *Pharmacol Res* 55:441-449
- Moon C, Ahn M, Wie M-B, Kim H-M, Koh C-S, Hong S-H, Kim M-D, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T (2005) Phenidone, a dual inhibitor of cyclooxygenases, ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzyme. *Brain Res* 1035:206-210
- Morgan IM (1947) Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *Journal of Experimental Medicine* 85:131-140
- Morikawa S, Takabe W, Matak C, Wada Y, Izumi A, Saito Y, Hamakubo T, Kodama T (2004) Global analysis of RNA expression profile in human vascular cells treated with statins. *J Atheroscler Thromb* 11:62-72
- Morimoto RI, Santoro MG (1998) Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 16:833-838
- Morris SD (2001) Heat shock proteins and the skin. *Exp Dermatol* 27:220-224
- Morrison LR (1947) Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. *Archives of Neurology and Psychiatry* 58:391-416
- Mosher DF, Doyle MJ, Jaffe EA (1982) Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 93:343-348
- Muchemwa FC, Nakatsura T, Fukushima S, Nishimura Y, Kageshita T, Ihn H (2008) Differential expression of heat shock protein 105 in melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res* 18:166-171

- Müller B, Peri G, Doni A, Torri V, Landmann R, Bottazzi B, Mantovani A (2001) Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlated with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med* 29:1404-1407
- Mumby SM, Raugi GJ, Bornstein P (1984) Interactions of thrombospondin with extracellular matrix proteins: selective binding to type V collagen. *J Cell Biol* 98:646-652
- Mycko MP, Papoian R, Boschert U, Raine CS, Selmaj KW (2003) cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions: detection of genes associated with disease activity. *Brain* 126:1048-1057
- Nachtigal P, Jamborova G, Pospisilova N, Pospechova K, Solichova D, Zdansky P, Semecky V (2006) Atorvastatin has distinct effects on endothelial markers in different mouse models of atherosclerosis. *J Pharm Pharm Sci* 9:222-230
- Nakazawa T, Takahashi H, Nishijima K, Shimura M, Fuse N, Tamai M, Hafezi-Moghadam A, Nisida K (2007) Pitavastatin prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death by suppressing leukocyte recruitment. *J Neurochem* 100:1018-1031
- Namazi MR (2004) Statins: novel additions to the dermatologic arsenal? *Exp Dermatol* 13:337-339
- Namazi MR (2007) Decreasing the expression of LFA-1 and ICAM-1 as well as hindering their interaction as the major mechanism for statin-induced dysfunction. *Ann Thorac Surg* 84:2137-2138
- Napoleone E, Di Santo A, Bastone a, Peri G, Mantovani A, de Gaetano G, Donate MB, Lorenzet R (2002) Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:782-787
- Narko K, Ristimäki A, MacPhee M, Smith E, Haudenschild CC, Hla T (1997) Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression. *J Biol Chem* 272:21455-21460
- Nath N, Giri S, Prasad R, Singh AK, Singh I (2004) Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J Immunol* 172:1273-1286
- Negishi M, Katoh H (2002) Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *J Biochem* 132:157-166
- Negre-Aminou P, van Vilet AK, van Erck M, van Thiel GC, van Leeuwen RE, Cohen LH (1997) Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. *Biochim Biophys Acta* 1345:259-268
- Neuhaus O, Strasser-Fuchs S, Fazekas F, Kieseier BC, Niederwieser G, Hartung HP, Archelos JJ (2002) Statins as immunomodulators. *Neurology* 59:990-997
- Neuhaus O, Stüve O, Archelos JJ, Hartung H-P (2005a) Putative mechanisms of action of statins in multiple sclerosis – comparison to interferon- β and glatiramer acetate. *J Neurol Sci* 233:173-177
- Neuhaus O, Stüve O, Zamvil ScS, Hartung H-P (2004) Are statins a treatment option for multiple sclerosis? *Lancet Neurol* 3:369-371
- Neuhaus O, Stüve O, Zamvil SS, Hartung HP (2005b) Evaluation of HMG-CoA reductase inhibitors for multiple sclerosis: opportunities and obstacles. *CNS Drugs* 19:833-841
- Neuhaus O, Wiendle H, Kieseier BC, Archelos JJ, Hartung H-P (2003) Cholesterinsenker eine neue Therapieoption bei Multiple Sklerose? *Nervenarzt* 74:704-708
- Newman MB, Bakay RA (2008) Therapeutic potentials of human embryonic stem cells in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 5:237-251

- Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247:1219-1222
- Nicot A, Ratnakar PV, Chen CC, Elkabes S (2003) Regulation of gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis indicates early neuronal dysfunction. *Brain* 126: 398-412
- Ogle CK, Kong F, Guo X, Wells DA, Aosasa S, Noel G, Horseman N (2000) The effect of burn injury on suppressors of cytokine signalling. *Shock* 14:392-399
- Oki Y, Younes A (2004) Heat shock protein-based cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* 3:403-411
- Okouchi M, Okayama N, Omi H, Imaeda K, Shimizu M, Fukutomi T, Itoh M (2003) Cerivastatin ameliorates high insulin-enhanced neutrophil-endothelial cell adhesion and endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibiting mitogen-activated protein kinase activation. *J Diabetes Complications* 17:380-386
- Oksenberg JR, Hauser SL (2005) Genetics of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:61-75
- Okutani D (2006) The role of long pentraxin 3, a new inflammatory mediator in inflammatory response. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 29:107-113
- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegaard D (1992) COMP is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem* 267:22346-22350
- Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA (1990) T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346:183-187
- Ozawa Y, Nakao K, Shimazaki T, Shimmura S, Kurihara T, Ishida S, Yoshimura A, Tsubota K, Okano H (2007) SOCS3 is required to temporally fine-tune photoreceptor cell differentiation. *Dev Biol* 303:591-600
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I (1997) Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 100:2671-2679
- Pahnke J, Mix E, Knoblich R, Müller J, Zschiesche M, Schubert B, Koczan D, Bauer P, Böttcher T, Thiesen H-J, Lazarov L, Wree A, Rolfs A (2004) Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor induces genes regulating migration and differentiation of neuronal progenitor cells. *Exp Cell Res* 297:484-494
- Paintlia AS, Paintlia MK, Singh A, Stanislaus R, Gilg AG, Barbosa E, Singh I (2004) Regulation of gene expression associated with acute experimental autoimmune encephalomyelitis by lovastatin. *J Neurosci Res* 77:63-81
- Paintlia AS, Paintlia MK, Singh AK, Singh I (2008a) Inhibition of rho family functions by lovastatin promotes myelin repair in ameliorating experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Pharmacol* 73:1381-1393
- Paintlia AS, Paintlia MK, Singh I, Skoff RB, Singh AK (2008b) Combination therapy of lovastatin and rolipram provides neuroprotection and promotes neurorepair in inflammatory demyelination model of multiple sclerosis. *Glia* 57:182-193
- Pannu R, Christie DK, Barbosa E, Singh I, Singh AK (2007) Post-trauma Lipitor treatment endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. *J Neurochem* 101:182-200
- Paraoanu LE, Weiss B, Robitzki AA, Layer PG (2005) Cytochrome-c oxidase is one of several genes elevated in marginal retina of the chick embryo. *Neuroscience* 132:665-672

- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129:3165-3172
- Paul F, Waiczies S, Wuerfel S, Wuerfel J, Bellmann-Strobl J, Dörr J, Waiczies H, Haertle M, Wernecke KD, Volk H-D, Aktas O, Zipp F (2008) Oral high-dose Atorvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS ONE* 3:e1928
- Paul WE (1997) Interleukin-4: signalling mechanisms and control of T cell differentiation. *Ciba Found Symp* 204:208-216
- Paydas S, Ergin M, Erdogan S, Seydaoglu G, Yavuz S, Disel U (2008) Thrombospondin-1 (TSP-1) and Survivin (S) expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res* 32:243-250
- Pelfrey CM, Moldovan IR, Cotleur AC, Zamor N, Rudick RA (2005) Effects of sex hormones on costimulatory molecule expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 167:190-203
- Pender MP (1995) Experimental autoimmune encephalomyelitis. In :Pender MP, McCombe PA, eds. *Autoimmune neurological disease*. New York: Cambridge University Press, 1995:26-88
- Peng X, Jin J, Giri S, Montes M, Sujkowski D, Tang Y, Smrka J, Vollmer T, Singh I, Markovic-Plese S (2006) Immunomodulatory effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors, potential therapy for relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 178:130-139
- Pepys MB, Baltz ML (1983) Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 34:141-212
- Peri G, Introna M, Corradi D, Lacuitti G, Signorini s, Avanzini F, Pizzetti F, Maggioni AP, Moccetti T, Metra M, Cas LD, Ghezzi P, Sipe JD, Re G, Olivetti G, Mantovani A, Latini R (2000) PTX3, a prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* 102:636-641
- Pesu M, Takaluoma K, Aittomäki S, Lagerstedt A, Saksela K, Kovanen PE, Silvennoinen O (2000) Interleukin-4-induced transcriptional activation by Stat6 involves multiple serine/threonine kinase pathways and serine phosphorylation of Stat6. *Blood* 95:494-502
- Peterson K, Sharp G, Tang H, Braley-Mullen H (1999) B7.2 has opposing roles during the activation versus effector stages of experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 162:1859-1867
- Pette M, Fujita K, Wilkinson D, Altmann DM, Trowsdale J, Giedrich G, Hinkkanen A, Epplen JT, Kappos L, Wekerle H (1990). Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7968-7972
- Pluchino S, Martino G (2008) The therapeutic plasticity of neural stem/precursor cells in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 265:105-110
- Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G (2005) Neurosphere-derived multipotent precursor promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 436:266-271
- Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, Blasi E, Agnello D, Grezzi P, Introna M, Bartfai T, Richards G, Mantovani A (2000) Inducible expression of the long pentraxin in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 106:87-94
- Polizzotto MN, Barlett PF, Turnley AN (2000) Expression of "Suppressor of cytokine signalling" (SOCS) genes in the developing and adult mouse. *J Comp Neurol* 423:348-358

- Pooler AM, Xi SC, Wurtman RJ (2006) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A reductase inhibitor pravastatin enhanced neurite outgrowth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 97:716-723
- Pope B, Brown RD, Gibson J, Yuen E, Joshua D (2000) B7-2-positive myeloma: incidence, clinical characteristics, prognostic significance, and implications for tumor immunotherapy. *Blood* 96:1274-1279
- Pregelj P (2008) Involvement of cholesterol in the pathogenesis of Alzheimer's disease: role of statins. *Psychiatr Danub* 20:162-167
- Presta M, Camozzi M, Salvatori G, Rusnati M (2007) Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med* 11:723-738
- Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho E-S (1993) Multiple sclerosis : remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33:137-151
- Raine CS (1984) Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelisation: its impact upon multiple sclerosis. *Lab Invest* 50:608-635
- Raine CS, Wu E (1993) Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:199-204
- Raiteri M, Arnaboldi L, McGeady P, Gelb MH, Verri D, Tabliabue C, Quarato P, Ferraboshi P, Santaniello E, Paoletti R, Fumagalli R, Corsini A (1997) Pharmacological control of mevalonate pathway: Effect on arterial smooth muscle cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 281:1144-1153
- Rajanikant GK, Zemke D, Kassab M, Majid A (2007) The therapeutic potential of statins in neurological disorders. *Curr Med Chem* 14:103-112
- Ramagopalan SV, Deluca GC, Degenhardt A, Ebers GC (2008) The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 201-202:183-199
- Rangel P, Cysneiros RM, Arida RM, Albuquerque M, Colugnati DB, Scorza CA, Cavaleiro EA, Scorza FA (2005) Lovastatin reduced neuronal cell death in hippocampal CA1 subfield after pilocarpine-induced status epilepticus. *Arq Neuropsiquiatr* 63:972-976
- Raska M, Weigl E (2005) Heat shock proteins in autoimmune diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149:243-249
- Raugi GJ, Mumby SM, Abbott-Brown D, Bornstein P (1982) Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. *J Cell Biol* 95:351-354
- Ravizza T, Moneta D, Botazzi B, Peri G, Garlanda C, Hirsch E, Richards GJ, Mantovani A, Vezzani A (2001) Dynamic induction of the long pentraxin PTX3 in the CNS after limbic seizures: evidence for a protective role in seizure-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 105:43-53
- Ravkina L, Harib I, Manovitch Z, Deconenko E, Letchinskajan E, Papilova E (1979) Hyperacute experimental allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys as a model of acute necrotizing hemorrhagic encephalomyelitis. *J Neurol* 221:113-125
- Reiss AB, Wirkowski E (2007) Role of HMG-CoA reductase inhibitors in neurological disorders: progress to date. *Drugs* 67:2111-2120
- Renfranz PJ, Cunningham MG, McKay RDG (1991) Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* 66:713-729
- Rieckmann P, Martin S, Weichselbraun I, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Brooks A, Luer W, Helwig A (1994) Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum from patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse. *Neurology* 44:2367-2372

- Riessen R, Axel DI, Fenchel M, Herzog UU, Rossmann H, Karsch KR (1999) Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on extracellular matrix expression in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 94:322-332
- Rikitake Y, Liao JK (2005) Rho GTPases, statins and nitric oxide. *Circ Res* 97:1232-1235
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in moneys. *J Exp Med* 58:39-53
- Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS (2001) Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signalling 3. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America* 98:9324-9329
- Rodriguez M, Zoecklein L, Gamez JD, Pavelko KD, Paoke LM, Nakane S, Howe C, Radhakrishnan S, Hansen M, David CS, Warrington AE, Pease LR (2005) STAT-4- and STAT-6-signaling molecules in a murine model of multiple sclerosis.
- Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK (2002) Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 22:e10-e18
- Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809
- Rossiello L, Ruocco E, Signoriello G, Micheli P, Rienzo M, Napoli C, Rossiello R (2007) Evidence of COX-1 and COX-2 expression in Kaposi's sarcome tissues. *Eur J Cancer* 43:1232-1241
- Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD (1991) A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 147:3788-3793
- Rubins JB, Greatens T, Kratzke RA, Tan AT, Polunovsky VA, Bitterman P (1998) Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1616-1622
- Ruggieri M, Avolio C, Livrea P, Trojano M (2007) Glatiramer Acetate in Multiple sclerosis: a review. *CNS Drug Rev* 13:178-191
- Ruggieri, Plica C, Lia A, Zimatore GB, Modesto M, Di Liddo E, Specchio LM, Livrea P, Trojano M, Avolio C (2008) Combination treatment of glatiramer acetate and monocycline affects phenotype expression of blood monocyte-derived cells in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 197:140-146
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signalling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277:42394-42398
- Sagara N, Kawaji T, Takano A, Inomata Y, Inatani M, Fukushima M, Tanihara H (2007) Effect of pitavastatin on experimental choroidal neovascularization in rats. *Exp Eye Res* 84:1074-1080
- Sage H, Farin FM, Striker GE, Fischer AB (1983) Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of the extracellular matrix. *Biochemistry* 22:2148-2155
- Saito Y, Yamagashi N, Hatayama T (2007) Different location of Hsp105 proteins in mammalian cells. *Exp Cell Res* 313:3707-3717
- Sakai I, Takeuchi T, Yamauchi H, Narumi H, Fujita S (2002) Constructive expression of SOCS3 confers resistance to IFN- α in chronic myelogenous leukaemia cells. *Blood* 100:2926-2931
- Sales KJ, Katz AA, Howard B, Soeters RP, Millar RP, Jabbour HN, Soeters RP (2002) Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Res* 62:424-432
- Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, De Acetis M, Maccagno A, Bottazzi B, Doni A, Bastone A, Mantovani G, Beck Peccoz P, Salvatori G, Mahoney DJ, Day AJ, Siracusa G, Romani L, Mantovani A (2004) PTX3

- play a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in vivo fertilization. *Development* 131:1577-1586
- Salvietti N, Cattaneo E, Govoni S, Rocchi M (1996) Changes in β amyloid precursor protein secretion associated with the proliferative status of CNS derived progenitor cells. *Neurosci Lett* 212:199-203
- Sankaranarayanan S, Price EA, Wu G, Crouthamel MC, Shi XP, Tugusheva K, Tyler KX, Kahana J, Ellis J, Jin L, Steele T, Stachel S, Coburn C, Simon AJ (2008) In vivo beta-secretase 1 inhibition leads to brain A β lowering and increased alpha-secretase processing of amyloid precursor protein without effect on neuregulin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 324:957-969
- Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T, Sharpe PT (2000) Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *PNAS* 97:4520-4524
- Scarpa M, Behboo R, Angriman I, Termini B, Barollo M, Ruffolo C, Polese L, D'Inca R, Sturniolo GC, D'Amico DF (2004) The role of costimulatory molecules CD80 and CD86 and IFN γ in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 49:1738-1744
- Scheele JS, Rhee JM, Boss GR (1995) Determination of absolute amounts of GDP and GTP bound to Ras in mammalian cells: comparison of parenteral and Ras-overproducing NIH3T3 fibroblasts. *Proc Natl Sci USA* 92:1097-1100
- Schmeer CW, Gamez A, Tausch S, Witte OW, Isenmann S (2008) Statins modulate heat shock protein expression and enhance retinal ganglion cell survival after transient retinal ischemia/reperfusion in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:4971-4981
- Schneider N, Lanz S, Ramer R, Schaefer D, Goppelt-Strube M (2001) Up-regulation of cyclooxygenase-1 in neuroblastoma cell lines by retinoic acid and corticosteroids. *J Neurochem* 77:416-424
- Schrempf W, Ziemssen T (2007) Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 6:469-475
- Schuster S, Nadjar A, Guo JT, Ittrich C, Hengerer B, Bezard E (2008) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase Inhibitor Lovastatin Reduces Severity of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements in experimental Parkinson's disease. *J Neurosci* 28:4311-4316
- Schwendimann RN (2006) Treatment of symptoms in multiple sclerosis. *Neurol Res* 28:306-315.
- Scolding N (2006) Stem cell therapy in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sklerosis* 12:677-678
- Seki Y-I, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston JA, Yoshimura A, Kubo M (2003) SOCS-3 regulates onset and maintenance of Th2-mediated allergic responses. *Nature Med* 9:1047-1054
- Sela M (1999) The concept of specific immune treatment against autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* 18:201-216
- Sena A, Pedrosa R, Graca Morais M (2003) Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J Neurol* 250:754-755
- Seth R, Raymond FD, Makgoba MW (1991) Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* 338:83-84
- Shan R, Banks K, Patel A, Shalini D, Terrell R, Powers PA, Fenton C, Dinanuer CA, Tuttle RM, Francis GL (2002) Intense expression of the B7-2 antigen presentation coactivator is an unfavourable prognostic indicator for differentiated thyroid carcinoma of children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metabol* 87:4391-4397

- Shaw SM, Filder JE, Yonan N, Williams SG (2008) Pleiotropic effects and cholesterol-lowering therapies. *Cardiology* 112:4-12
- Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoke K, Ito H (2005) Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol* 41:304-312
- Shin T, Lee Y, Sim KB (2003) Involvement of cyclooxygenase-1 and -2 in the sciatic nerve of rats with experimental autoimmune neuritis. *Immunol Invest* 32:123-130
- Siegel-Axel DI, Runge H, Seipel L, Riessen R (2003) Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell growth and extracellular matrix expression at varying glucose and low-density lipoprotein levels. *J Cardiovasc Pharmacol* 41:422-433
- Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC, Nachman RL (1984) Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. Modulation of activation by tissue activator. *J Clin Invest* 74:1625-1633
- Singec I, Janidal R, Crain A, Nikkhah G, Snyder EY (2007) The leading edge of stem cell therapeutics. *Annu Rev Med* 58:313-328
- Singh I, Paintlia AS, Khan M, Stanislaus R, Paintlia MK, Haq AK, Contreras MA (2004) Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment. *J Neurosci Res* 66:155-162
- Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE (1999) CD80 and CD86 are not equivalent in their ability to induce the tyrosine phosphorylation of CD28. *J Biol Chem* 274:3116-3124
- Sligh JE, Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL (1993) Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8529-8533
- Sobel RA, Mitchell ME, Fondren G (1990) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol* 136:1309-1316
- Spangenburg EE (2005) SOCS-3 induced myoblast differentiation. *J Biol Chem* 280:10749-10758
- Sparks DL, Sabbagh M, Connor D, Soares H, Lopez J, Stankovic G, Johnson-Travel S, Ziolkowski C, Browne P (2006) Statin therapy in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 114:78-86
- Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434
- Sriram S, Steiner I (2005) Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58:939-945
- Staffa JA, Chang J, Green L (2002) Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J* 346: 539-540
- Stamatakis K, Cernuda-Morollon E, Hernandez-Perera O, Perez-Sala D (2002) Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. *J Biol Chem* 277:49389-49396
- Stangel M, Gold R (2004) Use of IV immunoglobulins in neurology. Evidence-based consensus. *Nervenarzt* 75: 801-816
- Stanislaus R, Gilg AG, Singh AK, Singh I (2002) Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by Lovastatin. *Neurosci Lett* 333:167-170
- Stanislaus R, Singh AK, Singh I (1999) Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. *Neurosci Lett* 269:71-74
- Stanislaus R, Singh AK, Singh I (2001) Lovastatin treatment decreases mononuclear cell infiltration into the CNS of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 66:155-162

- Stark JL, Cross AH (2006) Differential expression of suppressors of cytokine signalling-1 and -3 and related cytokines in central nervous system during remitting versus non-remitting forms of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol* 18:347-353
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-921
- Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52:925-933
- Steinhilber D (2003) Nicht alles, was "Fett" ist, macht dick. *Forschung Frankfurt* 3-4:59-61
- Steinman L (1993) Autoimmune disease. *Sci Am* 269:106-114
- Steinman L (1999) Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron* 24:511-514
- Steinman L (2001) Multiple sclerosis: a two stage disease. *Nature Immunol* 2:762-765
- Steinman L (2003) Optic Neuritis, a new variant of experimental encephalomyelitis, a durable model for all seasons, now in its seventieth year. *J Exp Med* 197:1065-1071
- Steinman L, Martin R, Bernard CCA, Conlon P, Oksenberg JR (2002) Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 25:491-505
- Steinman L, Zamvil S (2005) Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol* 26:565-571
- Stenina OI, Topol EJ, Plow EF (2007) Thrombospondins, their polymorphisms, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1886-1894
- Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA (2005) Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 25:1569-1575
- Stolpe AV, Saag PT (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 74:13-33
- Stuart RW, Racke MK (2002) Targeting T cell costimulation in autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets* 6:275-289
- Stürzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, Frank JA, Staudt L, Martin R, McFarland HF (2003) Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 126:1419-1229
- Stüve O, Prod'homme Th, Slavin A, Youssef S, Dunn Sh, Steinman L, Zamvil S (2003a) Statins and their potential targets in multiple sclerosis therapy. *Exp Opin Ther Targets* 7:613-622
- Stüve O, Youssef S, Steinman L, Zamvil SS (2003b) Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. *Curr Opin Neurol* 16:393-401
- Stüve O, Youssef S, Weber M, Nessler S, von Büdingen H-C, Hemmer B, Prod'homme T, Sobel RA, Steinman L, Zamvil S (2006) Immunomodulatory synergy by combination of atorvastatin and glatiramer acetate in treatment of CNS autoimmunity. *J Clin Invest* 116:1037-1044
- Sun D, Fernandes G (2003) Lovastatin inhibits bone marrow-derived dendritic cell maturation and upregulates proinflammatory cytokine production. *Cell Immunol* 223:52-62
- Suvas S, Singh V, Sahdev S, Vohra H, Agrewala JN (2002) Distinct role of Cd80 and Cd86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem* 277:7766-7775

- Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A (2001) CIS3/SOCS3/SSI3 play a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp MED* 193:471-481
- Tagnauoti N, Loebrich S, Heisler F, Pechmann Y, Fehr S, De Arcangelis A, Georges-Labouesse E, Adams JC, Kneussel M (2007) Neuronal expression of muskelin in the rodent central nervous system. *BMC Neurosci* 8:28
- Takahashi HK, Mori S, Iwagaki H, Yoshino T, Tanaka N, Weitz-Schmidt G, Nishibori M (2005) Differential effects of LFA703, pravastatin, and fluvastatin on production of IL-18 and expression of ICAM-1 and CD40 in human monocytes. *J Leukoc Biol* 77:400-407
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208
- Takemoto M, Liao JK (2001) Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1712-1719
- Talwar S, Squire IB, Downie PF, McCullough AM, Campton MC, Davies JE, Barnett DB, Ng LL (2000) Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J* 21:1514-1521
- Tam SP, Lau P, Djiane J, Hilton DJ, Waters MJ (2001) Tissue-specific induction of SOCS gene expression by PRL. *Endocrinology* 142:5015-5026
- Tanaka S, Kato H, Koike T (2000) Microglia response factor (MRF-1): constitutive expression in ramified microglia and upregulation upon neuronal death by ischemia or glutamate exposure. *Zoolog Sci* 17:571-578
- Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ (2003) Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53:189-197
- Thomas PB, Albin T, Giri RK, See RF, Evans M, Rao NA (2005) The effects of atorvastatin in experimental autoimmune uveitis. *Br J Ophthalmol* 89:275-279
- Tian L, Catt JW, O'Neill C, King NJC (1997) Expression of Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules on murine embryonic stem cells. *Biol Reprod* 57:561-568
- Toledano JE, Partridge NC (2000) Statins: not just for cholesterol? *Trends Endocr Metabol* 11:255-256
- Topol EJ (2004) Intensive statin therapy - a sea change in cardiovascular prevention. *N Engl J* 350:1562-1564
- Tranguch S, Chakrabarty A, Guo Y, Wang H, Dey SK (2007) Maternal pentraxin 3 deficiency compromises implantation in mice. *Biol Reprod* 77:425-432
- Trebicka J, Henneberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J (2007) Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 46:242-253
- Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, Miyamoto K, Kiryu J, Honda Y (1998) In vivo evaluation of leukocyte dynamics in retinal ischemia reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:793-800
- Uccelli A, Frassoni F, Mancardi G (2007) Stem cells for multiple sclerosis: promises and reality. *Regen Med* 2:7-9
- van de Stolpe A, van der Saag PT (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 74:13-33
- Van Wijmeersch B, Sprangers B, Dubois B, Waer M, Billiau AD (2008) Autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Multiple sclerosis: perspective on mechanisms of action. *J Neuroimmunol* 197:89-98
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120

- Vigier R (2002) Fieberbehandlung im Kindesalter. *Paediatrica* 13:45-49
- Vollmer T, Key L, Durkalski V, Tylor W, Corboy J, Markovic-Plese S, Preiningerova J, Rizzo M, Singh I (2004) Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 363:1607-1698
- Vollmer T, Panitch H, Bar-Or A, Dunn J, Freedman MS, Gazda SK, Campagnolo D, Deutsch F, Arnold DL (2008) Glatiramer acetate after induction therapy with mitoxantrone in relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 14:663-670
- von Rahden BHA, Stein HJ, Pühringer F, Koch I, Langer R, Piontek G, Siewert JR, Höfler H, Sarbia M (2005) Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 65:5038-5044
- Vos HL, Devarayalu S, Vries Y, Bornstein P (1992) Thrombospondin 3 (Thbs 3), a new member of the thrombospondin gene family. *J Biol Chem* 267:12192-12196
- Voskuyl AE, Martin S, Melchers L, Zwinderman AH, Weichselbraun I, Breedveld FC (1995) Levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 and -3 but not circulating endothelial leucocyte adhesion molecule are increased in patients with rheumatoid vasculitis. *Br J Rheumatol* 34:311-315
- Waiczies S, Bendix I, Prozorovski T, Rather M, Nazarenko I, Pfueller CF, Brandt AU, Herz J, Brocke S, Ulrich O, Zipp F (2007) Geranylgeranylation but not GTP loading determines rho migratory function in T cells. *J Immunol* 179:6024-6032
- Waiczies S, Bendix I, Zipp F (2008) Geranylgeranylation but not GTP-loading of Rho GTPases determines T cell function. *Sci Signal* 1:pt3
- Waiczies S, Prozorovski T, Infante-Duarte C, Hahner A, Aktas O, Ullrich O, Zipp F (2005) Atorvastatin induces T cell anergy via Phosphorylation of ERK1. *J Immunol* 174:5630-5635
- Wakatsuki T, Hatayama T (1998) Characteristic expression of HSP-105-kDa heat shock protein (HSP105) in various tissues of nonstressed and heat-stressed rats. *Biol Pharm Bull* 21:905-910
- Waksman BH, Adams RD (1955) Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J of Experimental Medicine* 102:213-236
- Walcheck B, Kahn J, Fischer JM, Wang BB, Fisk RS, Payan DG, Feehan C, Betageri R, Darlak K, Spatola AF, Kishimoto TK (1996) Neurotrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 380:720-723
- Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, Weedon H, Papangelis V, Beroukas D, Roberts-Thomson PJ, Smith MD (2006) Changes in synovial tissue Jak-STAT expression in rheumatoid arthritis in response to successful DMARD treatment. *Ann Rheum Dis* 65:1558-1564
- Wang Q, Wang PH, McLachlan C, Wong PT (2005) Simvastatin reverses the downregulation of dopamine D1 and D2 receptor expression in the prefrontal cortex of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. *Brain Res* 1045:229-233
- Ward AC, Touw I, Yoshimura A (2000) The Jak/Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95:19-29
- Webb LM, Walmsley MJ, Feldmann M (1996) Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway (1996) Requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol* 26:2320-2328
- Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, Tischhoff I, Sommerer F, Markwarth A, Dietz A, Wittekind C, Tannapfel A (2005) SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* 24:6699-6708

- Weber MS, Hohlfeld R, Zamvil SS (2007a) Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 4:647-653
- Weber MS, Steinman L, Zamvil SS (2007b) Statins – treatment option for central nervous system autoimmune disease? *Neurotherapeutics* 4:693-700
- Weber MS, Stuve O, Neuhaus O, Hartung H-P, Zamvil SS (2007c) Spotlight of statins. *Int MS J* 14:93-97
- Weber MS, Zamvil SS (2008) Statins and demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol* 318:313-324
- Weilbach FX, Chan A, Toyka KV, Gold R (2004) The cardioprotector dexrazoxane augments therapeutic efficacy of mitoxantrone in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 135:49-55
- Weissman IL (2002) Stem cells – scientific, medical und political issues. *N Engl J Med* 346:1576-1579
- Weitz-Schmidt G (2002) Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 23:482-486
- Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U (2001) Statins selectively inhibit leucocyte function antigen-1 by binding to novel regulatory integrin site. *Nat Med* 7:687-692
- Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Dawson J, Kallen J (2004) Improved lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) inhibition by statin derivatives: molecular basis determined by x-ray analysis and monitoring of LFA-1 conformational changes in vitro and ex vivo. *J Biol Chem* 279:46764-46771
- Wekerle H (2002) Tackling multiple sclerosis. *Nature* 420:39-40
- Wenisch C, Myskiw D, Parschall B, Hartmann T, Dam K, Graninger W (1994) Soluble endothelium-associated adhesion molecules in patient with Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 98:240-244
- Whitacre CC (2001) Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2:777-780
- Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE (2001) Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identified 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J Neuroimmunol* 121:40-48
- Wight TN, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P (1985) Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J Histochem* 33:295-302
- Willerson JT, Ridker PM (2004) Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 109: 112-110
- Wisniewski HM, Keith AB (1977) Chronic relapsing experimental encephalomyelitis: an experimental model of multiple sclerosis. *Ann of Neurol* 1:144-148
- Wolk K, Hoflich C, Zuckermann-Becker H, Docke WD, Volk HD, Sabat R (2007) Reduced monocyte CD86 expression in postinflammatory immunodeficiency. *Crit Care Med* 35:458-467
- Wolozin B, Wang SW, Li N-C, Lee A, Lee TA, Kazis LE (2007) Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC Medicine* 5:20-31
- Won-Kyu JU, Neufeld AH (2002) Cellular localisation of cyclooxygenase-2 in the normal mouse, rat, and human retina. *J Comp Neurol* 452:392-399
- Wu JL, Matsui S, Zong ZP, Nishikawa K, Sun BG, Katsuda S, Fu M (2008) Amelioration of myocarditis by statin through inhibiting cross-talk between antigen presenting cells and lymphocytes in rats. *J Mol Cell Cardiol* 44:1023-1031
- Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ (2000) The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 19:2577-2584
- Wurster AL, Withers DJ, Uchida T, White MF, Grusby MJ (2002) Stat6 and IRS-2 cooperate in Interleukin 4 (IL-4)-induced proliferation and differentiation but are dispensable for IL-4-dependent rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol* 22:117-126

- Xenos ES, Stevens SL, Freeman MB, Cassada DC, Goldman MH (2005) Nitric oxide mediates the effect of fluvastatin on intracellular adhesion molecule-1 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells. *Ann Vasc Surg* 19:386-392
- Xue JH, Fukujama H, Nonoguchi K, Kaneko Y, Kido T, Fukumoto M, Fujibayashi Y, Itoh K, Fujita J (1998) Induction of Apg-1, a member of the heat shock protein 110 family, following transient forebrain ischemia in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 247:796-801
- Xun Z, Sowell RA, Kaufman TC, Clemmer DE (2008) Quantitative proteomics of a presymptomatic A53T α -synuclein *Drosophila* model of Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics* 7:1191-1203
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11:371-386
- Yamagishi N, Ishihara K, Saito Y, Hatayama T (2006) Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Exp Cell Res* 312:3215-3223
- Yang WF, Wang SZ (2004) Expression of CD1a, CD80, CD86 in dendritic cell of tumor tissue and regional lymph node in esophageal carcinoma. *Ai Zheng* 23:189-192
- Yasuda K, Ishihara K, Nakashima K, Hatayama T (1999) Genomic cloning and promoter analysis of the mouse 105kDa heat shock protein (HSP-105) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 256:75-80
- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A (2000) Negative regulation of cytokine signalling pathways. *Annu Rev Immunol* 18:143-164
- Ye Y, Martinez JD, Perez-Polo RJ, Lin Y, Uretsky BF, Birnbaum Y (2008) The role of eNOS and NF- κ B in upregulation and activation of cyclooxygenase-2 and infarct size reduction by atorvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:343-351
- Ye Y, Nishi SP, Manickavasagam S, Lin Y, Huang MH, Perez-Polo JR, Uretsky BF, Birnbaum Y (2007) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) by atorvastatin is mediated by 15-deoxy- Δ -12, 14-PGJ₂. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84:43-53
- Yilmaz A, Reiss C, Weng A, Cicha I, Stumpf C, Steinkasserer A, Daniel WG, Garlisch D (2006) Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 79:529-538
- Yilmaz A, Reiss Ch, Tantawi O, Weng A, Stumpf Ch, Raaz D, Ludwig J, Berger Th, Steinkasserer A, Daniel WG, Garlisch ChD (2004) HMG-CoA reductase inhibitors suppress maturation of human dendritic cells: new implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 172:85-93
- Youssef S, Stüve O, Pararroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, Bravo M, Mitchell DJ, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS (2002) The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420:78-84
- Yu K, Ge J, Summers JB, Li F, Liu X, Ma P, Kaminski J, Zhuang J (2008) TSP-1 secreted by bone marrow cells contributes to retinal ganglion cell neurite outgrowth and survival. *PLoS ONE* 3:e2470
- Yukawa K, Kishino M, Goda M, Liang XM, Kimura A, Tanaka T, Bai T, Owada-Makabe K, Tsubota Y, Ueyama T, Ichinose M, Maeda M, Takeda K, Akira S (2005) STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int J Mol Med* 15:225-230
- Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L (1985) T cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing EAE and demyelination. *Nature* 317:355-358

- Zamvil S, Steinman L (2003) Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 38:685-688
- Zamvil SS, Steinman L (1990) The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8:579-621
- Zamvil SS, Steinman L (2002) Cholesterol-lowering statins possess anti-inflammatory activity that might be useful for treatment of MS. *Neurol* 59:970-971
- Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plece S (2008) Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 180:6988-6996
- Zhang X, Lawler J (2007) Thrombospondin-based antiangiogenic therapy. *Microvasc Res* 74:90-99
- Zheng Z, Chen B (2007) Effects of Pravastatin on neuroprotection and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurosci Bull* 23:189-197
- Ziemssen T, Schrempf W (2007) Glatimer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 79:537-570

7. Thesen

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenenalters in der nördlichen Hemisphäre.
2. Die experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) ist ein aussagefähiges Tiermodell zur Untersuchung bestimmter Aspekte der Pathophysiologie und Therapie der MS.
3. Die durch Immunisierung mit dem Peptid der Aminosäuren 139-151 des Proteolipidproteins (PLP139-151), einem stark immunogenen Epitop des zentralen Myelins, induzierte EAE weist viele Ähnlichkeiten mit der häufigsten, chronisch remittierenden Verlaufsform der MS auf.
4. Dieses Tiermodell wurde benutzt, um Gene zu identifizieren, deren Expression durch Statine beeinflusst werden, die zu den gegenwärtig in intensiver Erprobung befindlichen, experimentellen oralen MS-Therapeutika zählen.
5. In drainierenden Lymphknoten und im Rückenmark Atorvastatin-behandelter EAE-Mäuse wurden mittels Mikroarrayanalyse 14 Gene gefunden, deren Expression nur durch die Statin-Behandlung und nicht durch die EAE-Induktion beeinflusst war.
6. Auf Proteinebene war die Expression von HSP105, COX-1, CD86 und ICAM-1 sowohl in Lymphknoten als auch im Rückenmark der Versuchstiere durch die Induktion der EAE und mehr noch durch die Atorvastatin-Behandlung beeinflusst. Das Ausmaß der Expressionsänderungen war von der Dauer der EAE und der Statin-Behandlung abhängig.
7. Die Proteinexpressionsänderungen spiegelten nur partiell die in der Mikroarrayanalyse gefundenen Änderungen auf Transkriptionsebene wider.
8. Um den Statin-Einfluß auf reparative Prozesse im ZNS beurteilen zu können, wurden Atorvastatin-Effekte auf die Expression der Statin-sensitiven Kandidatenproteine ICAM-1, HSP105, TSP-1, PTX-3, SOCS-3, COX-1, Ras und Phospho-STAT6 in neuralen Vorläuferzellen der Ratte (ST14A) untersucht.
9. Atorvastatin hat im untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-5}M - 10^{-7}M keinen toxischen Effekt auf die ST14A-Zellen.
10. Atorvastatin führt zu unterschiedlich starken Veränderungen der Expression der untersuchten Proteine in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Zellen (Proliferation oder Differenzierung), von der Expositionszeit und von der Konzentration.
11. ICAM-1 und HSP105 werden nur in proliferierenden Zellen, PTX-3, SOCS-3 und Phospho-STAT6 nur in differenzierenden und TSP-1, COX-1 und Ras sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden Zellen beeinflusst.
12. Überwiegend hochreguliert werden ICAM-1, TSP-1, SOCS-3, Phospho-STAT6 und HSP105, überwiegend herunterreguliert PTX-3, Ras und COX-1.

13. ICAM-1, HSP105 und Phospho-STAT6 reagieren nur auf Langzeitexposition (48h), PTX-3 und SOCS-3 nur auf Kurzzeitexposition (4h).
14. TSP-1 wird nur von der höchsten, PTX-3 und SOCS-3 nur von der niedrigsten Statin-Konzentration beeinflusst.
15. Die Identifizierung von Kandidatengenomen bzw. -proteinen sowie deren Veränderung unter Atorvastatin-Einwirkung können einen prediktiven Wert für den therapeutischen Statin-Effekt bei der EAE und möglicherweise auch bei der MS haben.
16. Die Ergebnisse könnten einen Beitrag zur Etablierung therapeutisch und prognostisch aussagefähiger Marker für klinische Studien am MS-Patienten leisten, wenn diese mit Statinen behandelt werden.

8. Persönliche Angaben und Dank

8.1. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Arndt Rolfs (Direktor des Albrecht-Kossel-Instituts für Neuroregeneration der Universität Rostock) danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für fachliche und finanzielle Unterstützungen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Wree (Direktor des Instituts für Anatomie der Universität Rostock) danke ich für seine uneingeschränkte Unterstützung der Arbeit.

Mein weitergehender Dank gilt **Herrn Dr. Eilhard Mix** (Klinik für Neurologie der Universität Rostock), der mich in die Problematik des Themas eingeführt und mit den Labormethoden vertraut gemacht hat, sowie für die kontinuierliche fachkompetente Betreuung.

Herrn Prof. emer. Dr. Dr. Gerd-Horst Schumacher (ehemaliger Direktor des Institutes für Anatomie der Universität Rostock) und **Herrn Prof. emer. Dr. Hans-Joachim Meyer-Rienecker** (ehemaliger Direktor der Klinik für Neurologie der Universität Rostock) bin ich für viele gute Ratschläge dankbar, mit denen sie den Fortgang dieser Arbeit begleitet haben.

Professionelle Hilfen erfuhr ich von den medizinisch-technischen Assistentinnen **Frau Michaela Kreienmeyer** (Klinik für Neurologie) sowie **Frau Frauke Winzer** (Institut für Anatomie), wofür ich ebenfalls herzlich danken möchte.

Meiner lieben Oma, meinen Eltern sowie **meiner Schwester** danke ich dafür, dass sie mich per Telefon mit lieben Worten aus meiner Heimat in der Hoffnung auf ein gutes Gelingen meiner Arbeit bestärkt haben.

8.2. Erklärung

Ich erkläre, dass ich ein Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades bisher an keiner wissenschaftlichen Einrichtung beantragt habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht genutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den

.....

Veronica Antipova

8.3. Lebenslauf

Name: Veronica Antipova

Geburtsdatum: 07.09.1972

Geburtsort: Minsk, Weißrussland (Belarus)

Staatsangehörigkeit: Weißrussisch

Studium und Berufserfahrung:

- 1979 – 1989 Mittelschule N 27 der Stadt Minsk
- 1989 – 1991 Studium an der Medizinischen Fachschule N 2 der Stadt Minsk
Diplom „Krankenschwester“
- 1991 – 1993 Krankenschwester in der Kinderpoliklinik N 2 der Stadt Minsk
- 1993 – 1998 Studentin der Stomatologischen Fakultät des Minsker
Medizinischen Instituts.
Qualifikation „Zahnärztin“
- 1998 – 08.2002 Assistentin am Lehrstuhl für Anatomie der Belorussischen
Staatlichen Medizinischen Universität
- 1999 – 08.2002 Vize-Chef, Internationales Departement der Belorussischen
Staatlichen Medizinischen Universität
- 09.2002- 03.2004 Doktorandin in der Klinik für Neurologie und Poliklinik,
Medizinische Fakultät, Universität Rostock,
Neurobiologisches Labor
- ab 04.2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie,
Medizinische Fakultät, Universität Rostock

8.4. Publikationen

Roudenok, V. V., L. Gutjar, V. Antipova, Y. Rogov. Expression of vasoactive intestinal polypeptid and calcitonin gene-related peptide in human stellate ganglia after acute myocardial infarction. *Ann. Anat., Jena*, 2001, 183, p. 341-344.

Roudenok, V., W. Kühnel, V. Antipova, H. Neviglas. Distribution of the neurotransmitters in the ganglion mesentericum superius of the man. *Morphological newsletter. Moscow-Minsk*, 2002, p. 37-39

Mix E, S.M. Ibrahim, J. Pahnke, A. Glass, I. Mazon-Pelaez, S. Lemcke, D. Koczan, U. Gimsa, S. Bansemer, Th. Scheel, Th. Karopka, T. Böttcher, J. Müller, E. Dazert, V. Antipova, R. Hoffrogge, A. Wree, M. Zschiesche, U. Strauß, G. Kundt, R. Warzok, L. Gierl, A. Rolfs. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor Atorvastatin mediated effects depend on the activation status of target cells in PLP-EAE. *J Autoimmun*, 27(4), (2006), p. 251-265

9. Anhang

9.1. Anhang A (Materialien)

Tabelle 1. Lösungen und Puffer

Nr	Komponenten	Endkonzentration	Stockkonzentration	Zugabemenge	Hersteller	Katalog-Nr.
L ₁	Dilbecco's MEM-Glutamax I (DMEM)			500 ml	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe	21885-025
	Penicillin/Streptomycin		50IU/ml 60µg/ml	5,5 ml	Biochrom AG, Berlin	A 2213
	FBS		10%	55 ml	Biochrom AG, Berlin	S 0115
L ₂	DMSO				Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim	D-2650
L ₃	Elektrodenpuffer					
	TRIS	25 mM	121,14 g/mol	3,03 g	Roth, Karlsruhe	4855.2
	Glycin	188 mM	75,07 g/mol	14,1 g	Roth, Karlsruhe	3908.2
	SDS	3,5 mM	288,4 g/mol	1,0 g	Serva, Heidelberg	20783
	Aqua dest. ad			1000 ml		
L ₄	Gefriermedium					
	FBS	90%		450 ml	Biochrom AG, Berlin	S 0115
	DMSO	10%		50 ml	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim	D 2650
L ₅	1x Laemmlipuffer					
	SDS	2%	288,4 g/mol	1g	Serva, Heidelberg	20783

	Glycerin	10%	87 %	5,7 g	Merck, Darmstadt	1.04094.1000
	EDTA pH 6,8	5 mM	372,24 g/mol	92,5 mg	Merck, Darmstadt	1.12029.1000
	TRIS pH6,8	62,5 mM	121,14 g/mol	0,4 g	Roth, Karlsruhe	4855.2
	Bromphenolblau	0,5 %	692 g/mol	1 ml	Serva, Darmstadt	15375
	β -Mercaptoethanol	5 %	78,13 g/mol	frisch zuge- geben	Roth, Karlsruhe	4227.1
	Aqua dest. ad			50ml		
L₆	Nissl-Lösung					
	Cresyl Violet acetate	0,1%		0,25 g	Sigma- Aldrich, Steinheim	C 1791-5 G
	Aquabidest.			250 ml	bei 60°C lösen, dann filtrieren	
L₇	Odyssey® Blockpuffer			125 ml	LI-COR Bioscience, Bad Homburg	927-40000, 827-06899
L₈	PBS-Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺				Biochrom AG, Berlin	L 1825
L₉	PFA (pH=7,0)	3,7 %				
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O		137,99g/ mol	4g	Merck, Darmstadt	1.06346.1000
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O		177,99 g/mol	8,15g	Merck, Darmstadt	1.06580.1000
	PFA			37,0g	Merck, Darmstadt	1.04005.1000
	Aqua dest. ad			1000 ml		
L₁₀	PBS (pH=7,4)					
	NaCl	137 mM	58,44 g/mol	8,00 g	J.T.Baker, Griesheim	0278
	KCl	2,7 mM	74,56	0,20 g	Merck,	1.04936.1000

			g/mol		Darmstadt	
	Na ₂ HPO ₄	10 mM	177,99 g/mol	1,42 g	Merck, Darmstadt	1.06580.1000
	KH ₂ PO ₄	2 mM	136,09 g/mol	0,27 g	Merck, Darmstadt	1.04873.0250
	Aqua dest. ad			1000 ml		
L₁₁	PBS-Tween 20					
	PBS (pH=7,4)	0,1 M		20 ml		
	Tween® 20	0,1%		20µl	Sigma- Aldrich, Steinheim	P 5927
L₁₂	SDS- Transferpuffer					
	TRIS	48 mM	121,14 g/mol	5,82 g	Roth, Karlsruhe	4855.2
	Glycin	39 mM	75,07 g/mol	2,93 g	Roth, Karlsruhe	3908.2
	SDS	1,3 mM	10 %	3,75 ml	Serva, Heidelberg	20783
	Methanol	20 %	32,04 g/mol	200 ml	Merck, Darmstadt	1.13351.2500
	Aqua dest. ad			1000 ml		
L₁₃	Trypsin/EDTA				GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe	25300-054
L₁₄	Trypanblau (Trypan Blue Solution), 20 ml				Sigma- Aldrich, Steinheim	T 8154

Tabelle 2. Biochemikalien

Nr.	Bezeichnung	Hersteller	Bestell-Nr.
B₁	Atorvastatin	Sortis, Pfizer, Karlsruhe	
B₂	BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford	23225

B₃	cOmplete, Mini, Tabletten	Roche Diagnostik GmbH, Penzberg	11 836 153 001
B₄	15% Criterion Tris-HCL Criterion Precast Gel 1,0mm; 12+2 comb, 45µl	Bio-Rad, München	345-0019
B₅	Entellan, Neu	Merck KGaA, Darmstadt	1.07961.0500
B₆	37% Formaldehyde solution	J.T. Baker, Deventer, Holland	7040
B₇	PeqGold Protein-Marker IV (Prestained)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen	27-2110, 10 x 0,25 ml
B₈	Triton X 100	Ferak, Berlin	505002
B₉	Tween 20	Serva, Heidelberg	37470
B₁₀	T-PER Tissue Protein Extraction Reagent	Pierce, USA	78510
B₁₁	Xylol	J T Baker, Greisheim	8118

Tabelle 3. Verbrauchsmaterial

Nr.		Hersteller	Bestell-Nr.
V₁	100 mm Petrischalen	Biochrom, Berlin	P-93 100
V₂	60 mm Petrischalen	Biochrom, Berlin	P-93 600
V₃	96-Well-Flachbodenplatten	Falcon, Franklin, USA	3072
V₄	Combitips [®] plus 0,1 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.200
V₅	Combitips [®] plus 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.218
V₆	Combitips [®] plus 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.226
V₇	Combitips [®] plus 1 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.234
V₈	Combitips [®] plus 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.242
V₉	Combitips [®] plus 5,0 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.250
V₁₀	Combitips [®] plus 10 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.269
V₁₁	Combitips [®] plus 25 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.293
V₁₂	Combitips [®] plus 50 ml	Eppendorf, Hamburg	0030 069.277
V₁₃	Falcon Culture Slides, 8 well, VE=24 Stck.	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	354118
V₁₄	Falconröhrchen 15 ml	Roth, Karlsruhe	459.1
V₁₅	Multipette [®] plus	Eppendorf, Hamburg	4981 000.019
V₁₆	Kryoröhrchen und Kryodeckel	Biozym, Oldendorf	710025, 710040
V₁₇	Nitrocellulosemembran Hybond ECL, Version LRPND 95/98, 30 cm x 3	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	RPN 303D
V₁₈	Reaktionsröhrchen 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030.102.086
V₁₉	Zellkulturpipette 10 ml, kurz	Greiner	607 190
V₂₀	Zellkulturpipette 10 ml, lang	Greiner	607 180
V₂₁	Zellkulturpipetten 5 ml, kurz	Greiner	606 190
V₂₂	Zellkulturpipetten 5 ml, lang	Greiner	606 180

Tabelle 4. Geräte

Nr.	Bezeichnung	Hersteller
G₁	Brutschrank	Heraeus, Hanau

G₂	Bürker-Zählkammer	Merck, Darmstadt
G₃	Criterion cell	Bio-Rad, München
G₄	Lichtmikroskop "Zeiss"	Zeiss, Göttingen
G₅	Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
G₆	Perfect Western™ Containers: extra large, black	WAK- Chemie Medical GmbH, Steinbach
G₇	pH-Meter CG 840	Schott-Geräte, Hofheim
G₈	Photometer SLT. Spectra II	Tecan, Crailsheim
G₉	Semi dry blot chamber	Bio-Rad, München
G₁₀	Sterilbank "Lamin Air"	Heraeus, Hanau
G₁₁	Thermomixer 5436	Effendorf, Hamburg
	<u>Zentrifugen:</u>	
G₁₂	Biofuge 13 (Rotor 3757)	Heraeus, Hanau
G₁₃	Kühlzentrifuge Universal 30 RF (Rotor E 1174)	Hettich, Tuttlingen
G₁₄	Tischzentrifuge EBA 12 (Rotor E806)	Hettich, Tuttlingen
G₁₅	Minizentrifuge 5415	Beckham Instruments, München
G₁₆	Megafuge 1.0 R (Rotor 3360)	Heraeus, Hanau

Tabelle 5. Software

Nr.	Bezeichnung	Hersteller
S₁	Easy win fitting	Tecan Crailsheim
S₂	Exell Office Excel 2003	Microsoft Corporation
S₃	Microsoft Office	Microsoft Corporation
S₄	Odyssey Software Version 1.2	LI-COR, Bioscience, Bad Homburg

Tabelle 6. Primäre Antikörper (Western-Blot)

Nr.	Bezeichnung	Antigen	Wirt	Hersteller	Katalog-Nr.
A₁	Anti-β-Aktin, Klon AC-15	β-Aktin	Maus, monoklonal	Sigma, Taufkirchen	A 5441
A₂	Anti-CD86 (B7-2)	CD86 (B7-2)	Ratte, monoklonal	BD Biosciences, Pharmingen	553689
A₃	Anti-Cyclooxygenase-1 (COX-1)	COX-1	Kaninchen, polyklonal	Chemicon, Hofheim	AB5116; LOT:24020386
A₄	Anti-Interzelluläre Adhäsion Moleküle-1 (ICAM-1)	ICAM-1	Ziege, polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden	AF796; LOT:GRG01
A₅	Anti-Hitze-Shock-Protein-105 (HSP105)	HSP105	Ziege, polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	SC-1804

Tabelle 7. Sekundäre Antikörper (Western-Blot)

Nr.	Bezeichnung	Antigen	Wirt	Hersteller	Katalog-Nr.
A₆	Alexa Fluor 680	Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Molecular Probes, Karlsruhe	A-21109
A₇	Alexa Fluor 680	Ratte IgG	Ziege	Molecular	A-21096

		(H+L)		Probes, Karlsruhe	
A₈	Alexa Fluor 680	Ziege IgG (H+L)	Esel	Molecular Probes, Karlsruhe	A-21084
A₉	IRDye 800CW konjugiert	Maus IgG [H&L]	Ziege	Rockland, Hamburg	610-131-121

Tabelle 8. Primäre Antikörper (In-Zell-Western-Analyse)

Nr.	Bezeichnung	Antigen	Wirt	Hersteller	Katalog-Nr.
A₁₀	Anti-β-Aktin, Klone AC-15	β-Aktin	Maus, monoklonal	Sigma, Taufkirchen	A 5441
A₁₁	Anti-Ras	Ras	Maus, monoklonal	BD Biosciences, Pharmingen	61002
A₁₂	Anti-ICAM-1	ICAM-1	Ziege, polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden	AF 796
A₁₃	Anti- Thrombospondin	TSP-1	Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	Ab1823
A₁₄	Anti-SOCS-3 (M-20)	SOCS-3	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg	sc-7009
A₁₅	Anti-HSP105 (M-20)	HSP105	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg	sc-1804
A₁₆	Anti-PTX-3	PTX-3	Ratte, monoklonal	Alexis Biochemicals GmbH, Grünberg	ALX-804- 463-C100
A₁₇	Anti-COX-1 « alt »	COX-1	Kaninchen, polyklonal	Chemicon International, Hofheim	AB5116
A₁₈	Anti-COX-1 « neu »	COX-1	Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	Ab695
A₁₉	Anti-P-STAT-6	P-STAT-6 (Y641)	Maus, monoklonal	BD Biosciences, Pharmingen	S99220

Tabelle 9. Sekundäre Antikörper (In-Zell-Western-Analyse)

Nr.	Bezeichnung	Antigen	Wirt	Hersteller	Katalog-Nr.
A₂₀	Alexa Fluor 680	Gegen Kaninchen IgG (H+L) konjugiert	Aus der Ziege	Molecular Probes, Karlsruhe; gekauft von Invitrogen, Karlsruhe	A-21109

Dieser Antikörper wurde für die COX-1 „alt“ benutzt.

A ₂₁	Alexa Fluor 680	gegen Ratte IgG (H+L) konjugiert	Aus der Ziege	Molecular Probes, Karlsruhe; gekauft von Invitrogen, Karlsruhe	A-21096
-----------------	-----------------	---	------------------	---	---------

Dieser Antikörper wurde für PTX-3 benutzt.

A ₂₂	Alexa Fluor 680	gegen Ziege IgG (H+L) konjugiert	aus dem Esel	Molecular Probes, Karlsruhe; gekauft von Invitrogen, Karlsruhe	A-21084
-----------------	-----------------	---	-----------------	---	---------

Dieser Antikörper wurde für ICAM-1, SOCS-3, HSP105 benutzt.

A ₂₃	IRDye 800CW konjugiert	Gegen Maus IgG [H&L]	Aus der Ziege	Rockland Immunochemicals Inc. Gilbertsville, PA; gekauft von BIOMOL, Hamburg	610-131-121
-----------------	---------------------------	----------------------------	------------------	---	-------------

Dieser Antikörper wurden für β -Aktin, Ras und TSP-1 benutzt.

9.2. Anhang B (Ergebnisse: Originaldaten)

Originalbilder von allen Western-Blots der Experimente zur Untersuchung des Statineffekts auf die Expression Statin-sensitiver Proteine in Lymphknoten und im Rückenmark von EAE-Mäusen (mit Ausnahme der im Hauptteil beispielhaft gezeigten Western-Blots zum Nachweis von ICAM-1)

Pentraxin-3 (PTX-3)

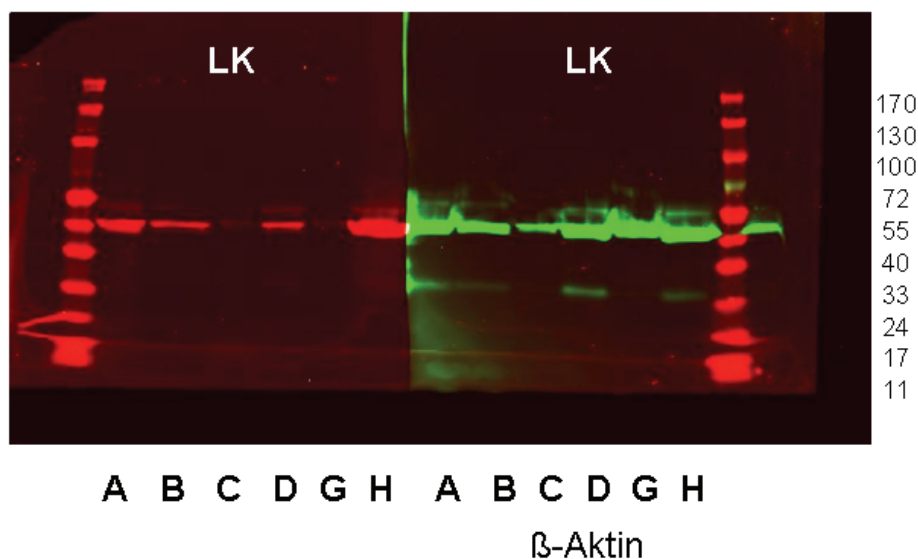


Abb. 1 Proteinexpression von PTX-3 in Lymphknoten (LK) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A-D = 0, 10, 20 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A-D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10.- 20. Tag n.i., H = vom 10. - 30. Tag n.i.). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für PTX-3 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

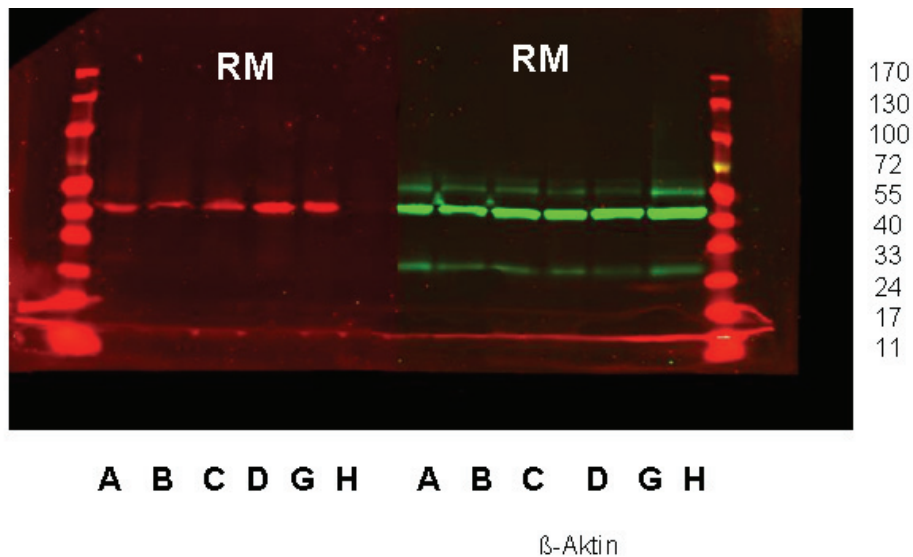


Abb. 2 Proteinexpression von PTX-3 im Rückenmark (RM) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A-D = 0, 10, 20 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A-D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10.- 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für PTX-3 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

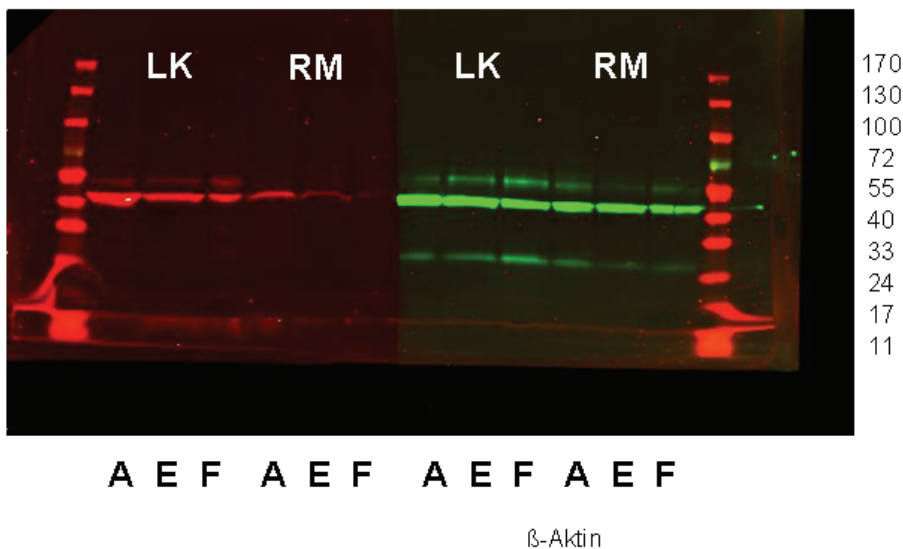
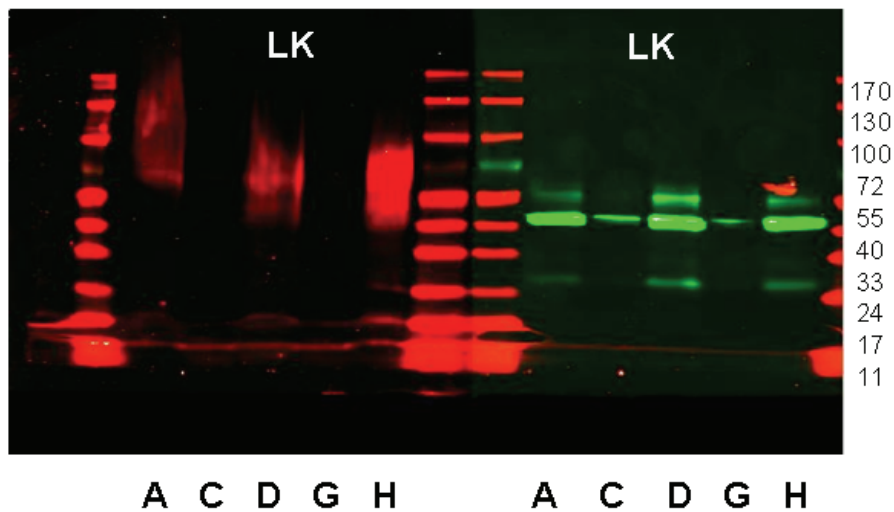


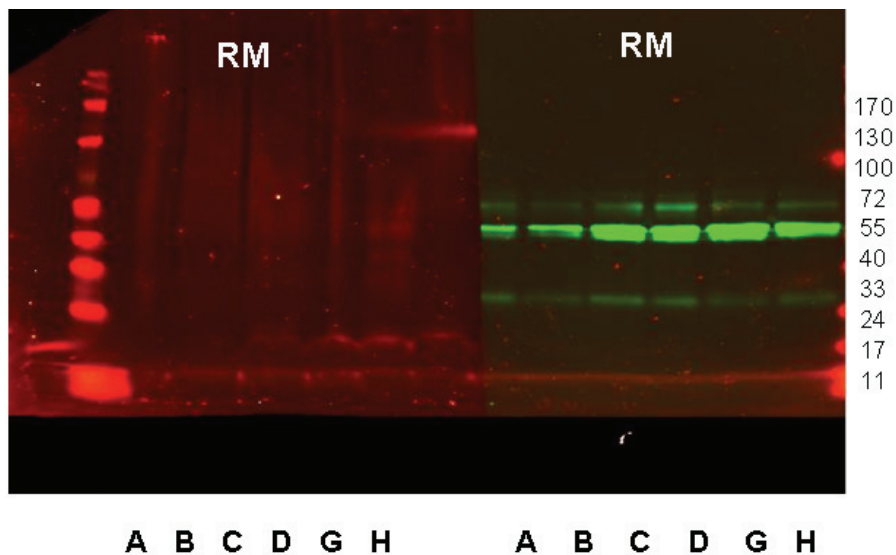
Abb. 3 Proteinexpression von PTX-3 in Lymphknoten (LK) und im Rückenmark (RM) von Kontrollmäusen ohne Atorvastatinbehandlung (A) und mit Atorvastatinbehandlung (E = 10 Tage Behandlung, F = 20 Tage Behandlung). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für PTX-3 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

CD86



β-Aktin

Abb. 4 Proteinexpression von CD86 in Lymphknoten (LK) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A, C, D = 0, 20, 30 n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A, C, D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10. – 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Auf Grund nicht genügend vorhandenen Lymphknotengewebes von Tieren der Gruppe B konnte diese Tiergruppe nicht auf CD86-Expression untersucht werden. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für CD86 (rot) und für das „housekeeping“ Protein β-Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.



β-Aktin

Abb. 5 Proteinexpression von CD86 im Rückenmark (RM) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A-D = 0, 10, 20 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A-D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10.- 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für CD86 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β-Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

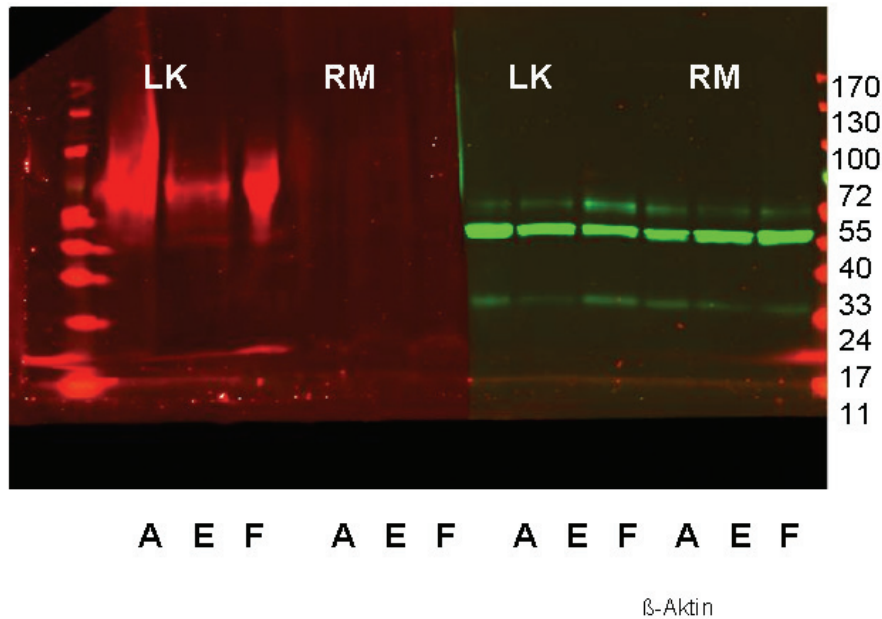


Abb. 6 Proteinexpression von CD86 in Lymphknoten (LK) und im Rückenmark (RM) von Kontrollmäusen ohne Atorvastatinbehandlung (A) und mit Atorvastatinbehandlung (E = 10 Tage Behandlung, F = 20 Tage Behandlung). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für CD86 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

HSP105

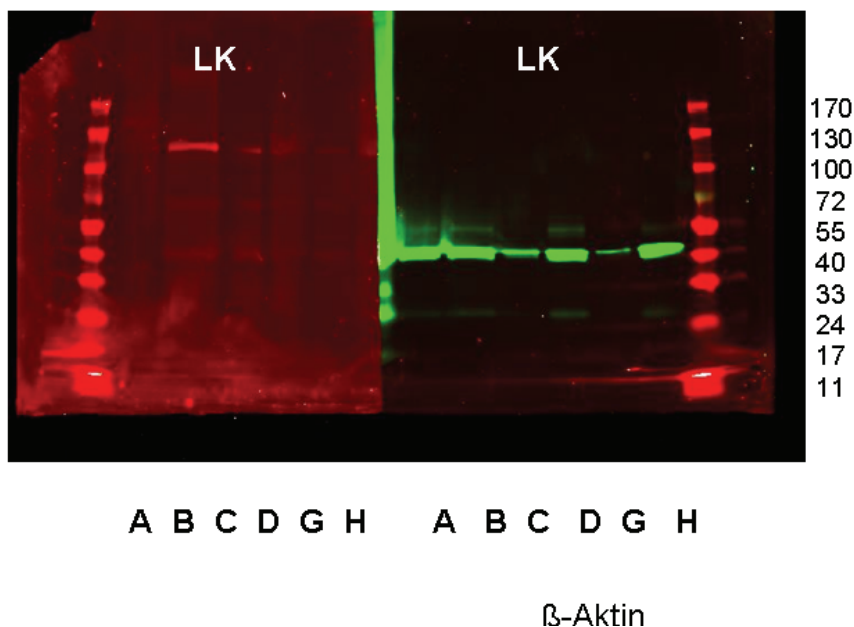


Abb. 7 Proteinexpression von HSP105 in Lymphknoten (LK) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A-D = 0, 10, 20 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A-D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10.- 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für HSP105 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

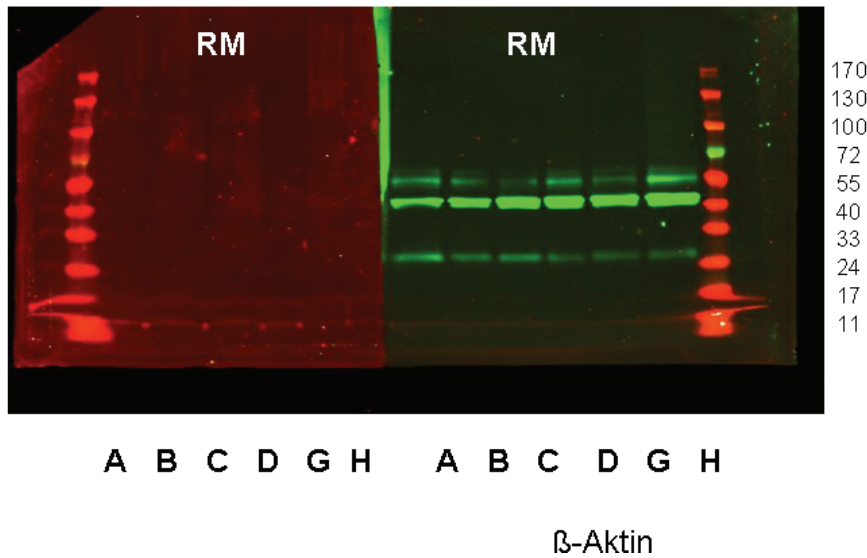


Abb. 8 Proteinexpression von HSP105 im Rückenmark (RM) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A-D = 0, 10, 20 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A-D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10.- 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für HSP105 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

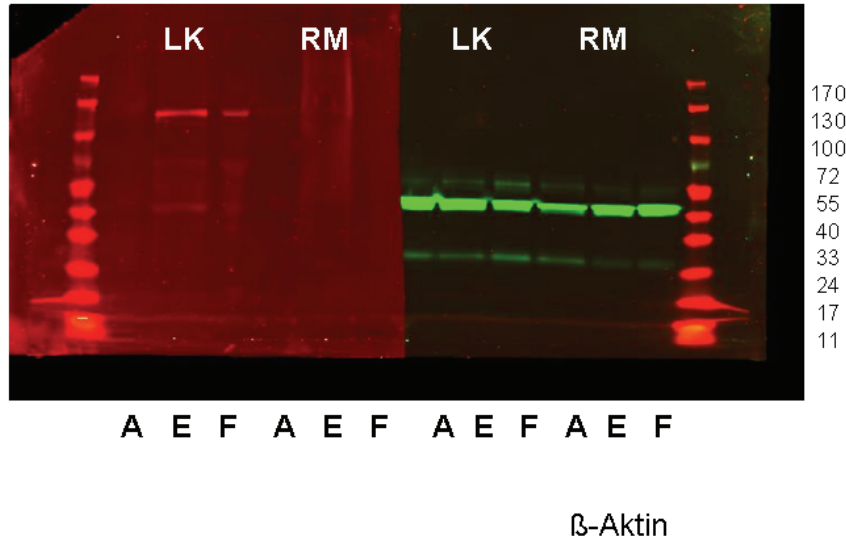


Abb. 9 Proteinexpression von HSP105 in Lymphknoten (LK) und im Rückenmark (RM) von Kontrollmäusen ohne Atorvastatinbehandlung (A) und mit Atorvastatinbehandlung (E = 10 Tage Behandlung, F = 20 Tage Behandlung). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für HSP105 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

Cyclooxygenase-1 (COX-1)

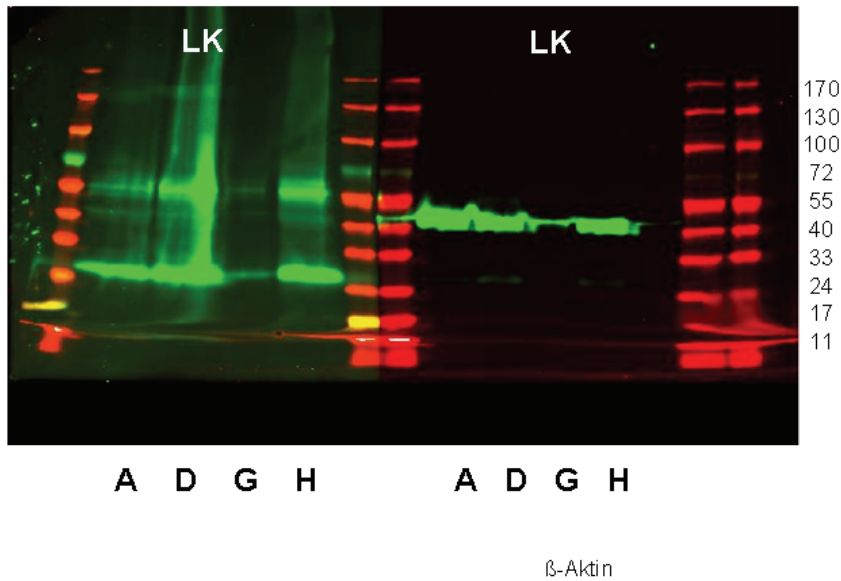


Abb. 10 Proteinexpression von COX-1 in Lymphknoten (LK) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A und D = 0 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A und D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10.- 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Auf Grund nicht genügend vorhandenen Lymphknotengewebes von Tieren der Gruppen B und C konnten diese Tiergruppen nicht auf COX-1-Expression untersucht werden. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für COX-1 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β-Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

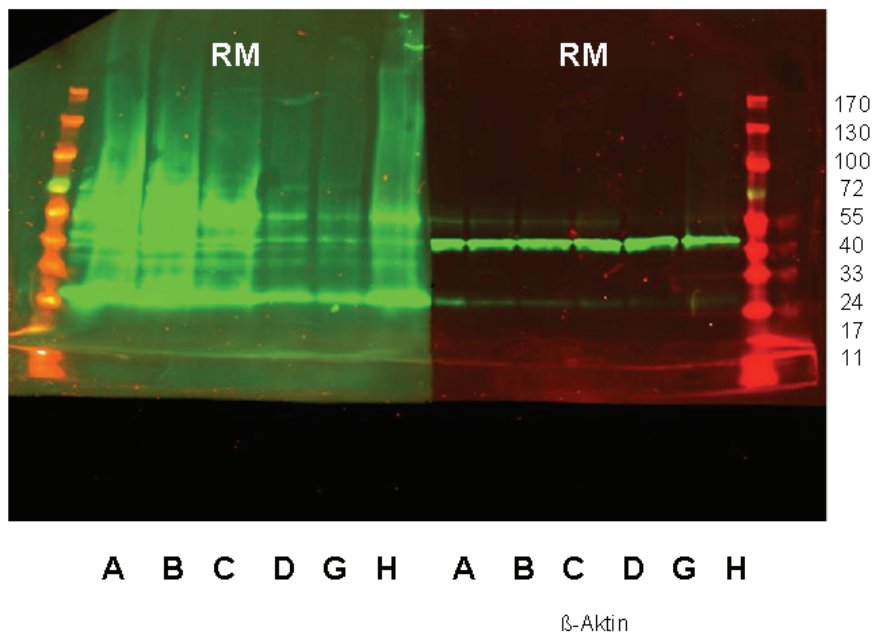


Abb. 11 Proteinexpression von COX-1 im Rückenmark (RM) von EAE-Mäusen im Krankheitsverlauf (A-D = 0, 10, 20 und 30 Tage n.i.) ohne Atorvastatinbehandlung (A-D) und mit Atorvastatinbehandlung (G = vom 10.- 20. Tag n.i., H = vom 10. – 30. Tag n.i.). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für COX-1 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β-Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

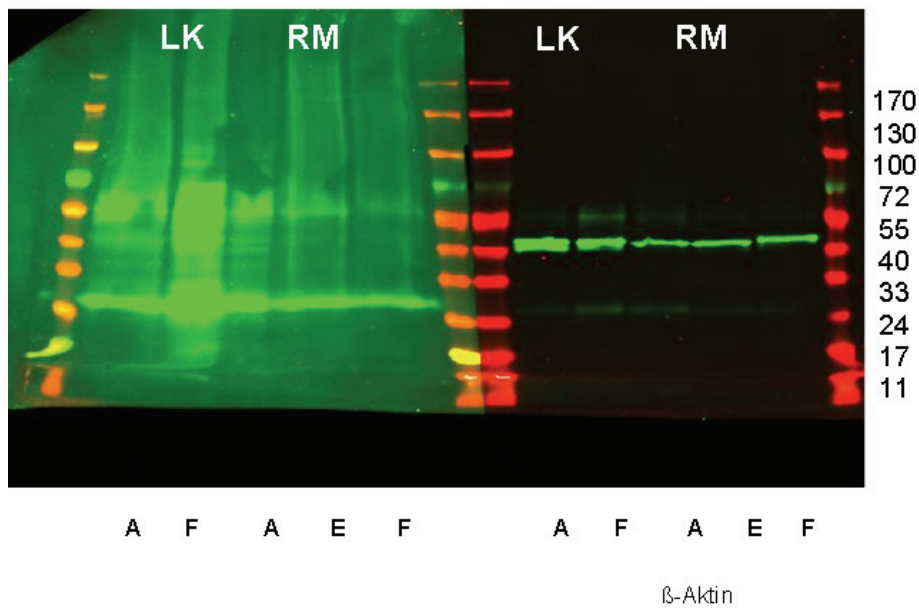


Abb. 12 Proteinexpression von COX-1 in Lymphknoten (LK) und im Rückenmark (RM) von Kontrollmäusen ohne Atorvastatinbehandlung (A) und mit Atorvastatinbehandlung (E = 10 Tage Behandlung, F = 20 Tage Behandlung). Auf Grund nicht genügend vorhandenen Lymphknotengewebes von Tieren der Gruppe E konnte diese Tiergruppe nicht auf COX-1-Expression untersucht werden. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode unter Verwendung von fluoreszierenden sekundären Antikörpern für COX-1 (rot) sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin (grün). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind in kD angegeben.

Originalbilder aller Mikrotiterplatten der einzelnen Experimente zur Untersuchung des Statineffekts auf die Expressionskinetik Statin-sensitiver Proteine in ST14A-Zellen mittels In-Zell-Western-Analyse (mit Ausnahme der im Hauptteil beispielhaft gezeigten In-Zell-Western-Platte 1 des Experiment 1)

Experiment 1, Platte 2

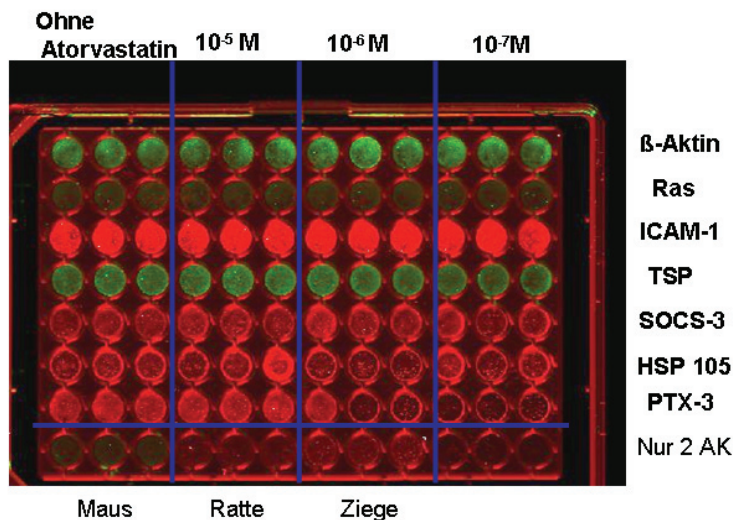


Abb. 13 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1, SOCS-3, HSP105 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M und 10⁻⁷ M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte mit geeigneten unmarkierten Primärantikörpern und Sekundärantikörpern, die mit im nahen Infrarotbereich emittierenden Fluorochromen markiert waren. Für die Fluoreszenzmessung wurde der mit dem Odyssey-System ausgestattete Fluoreszenz-Scanner der Fa. Licor verwendet. Die Messungen erfolgten jeweils in drei parallelen Wells. Die spezifischen Fluoreszenzintensitäten wurden durch Subtraktion der Fluoreszenzsignale der Zellen erhalten, die nur mit dem korrespondierenden Sekundärantikörper inkubierten wurden (siehe unterste Reihe), nachdem die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert worden war. Die Signalstärken der jeweiligen Zielproteine (in diese Falle: Ras, ICAM-1, TSP-1, SOCS-3, HSP105 und PTX-3) wurden unter Bezug auf das als Referenzprotein dienende β -Aktin normalisiert.

Experiment 1, Platte 3

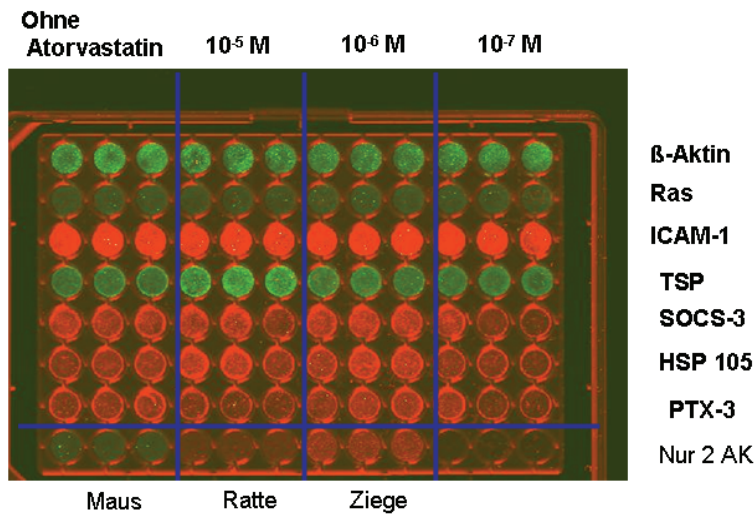


Abb. 14 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1, SOCS-3, HSP105 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb.13 beschrieben.

Experiment 1, Platte 4

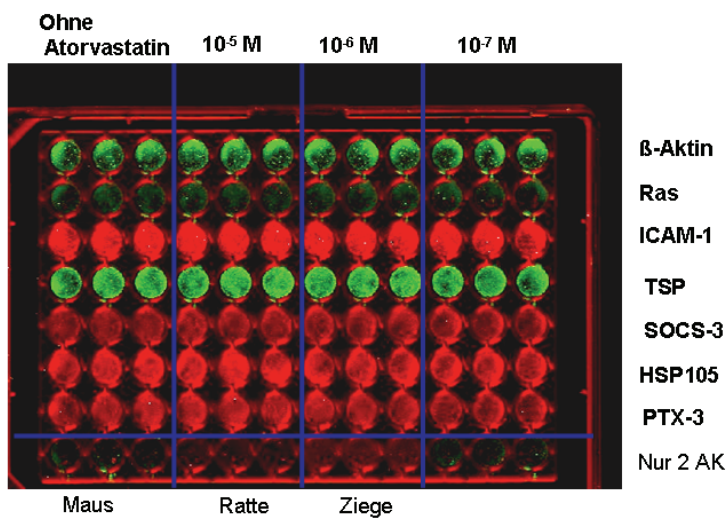


Abb. 15 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1, SOCS-3, HSP105 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 1, Platte 5

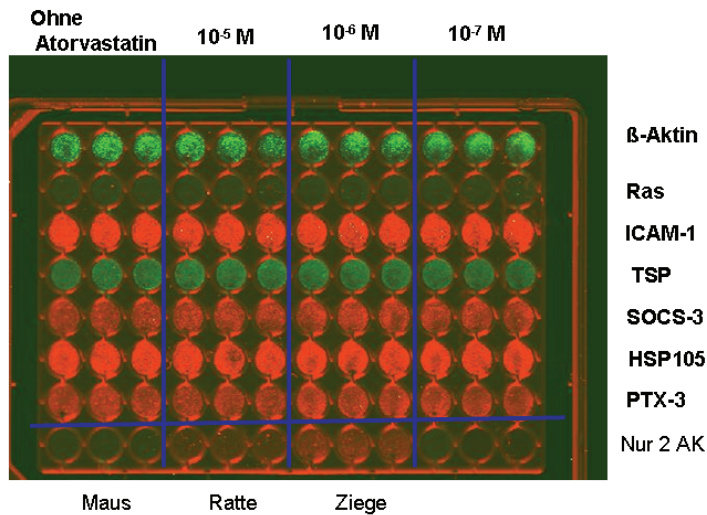


Abb. 16 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1, SOCS-3, HSP105 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 1, Platte 6

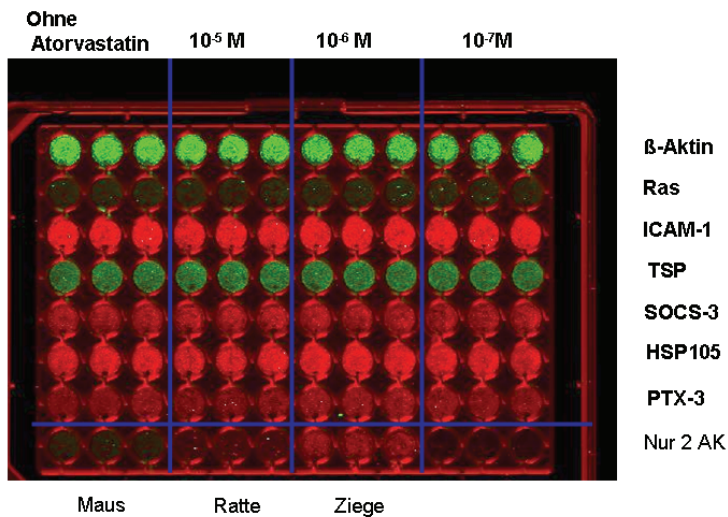


Abb. 17 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1, SOCS-3, HSP105 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 1

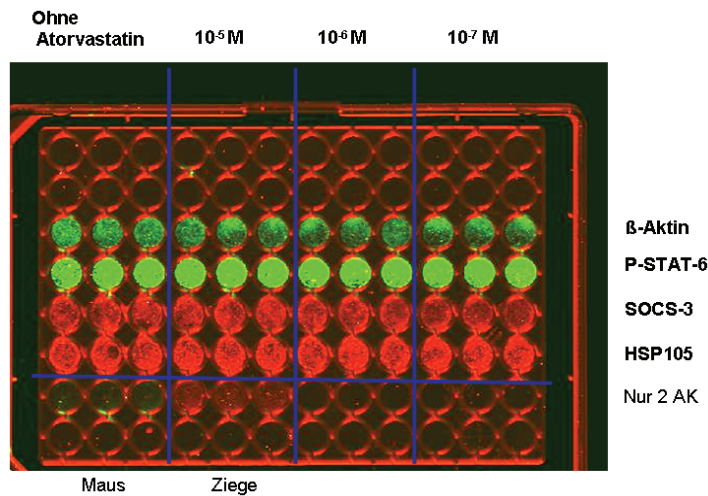


Abb. 18 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, P-STAT-6, SOCS-3 und HSP105 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 2

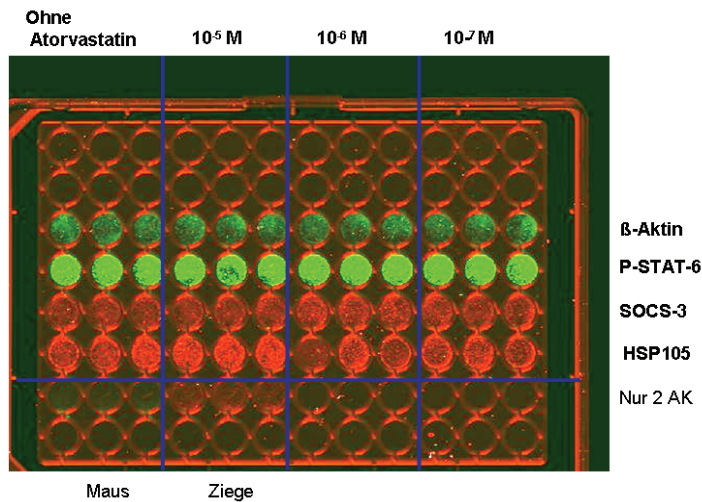


Abb. 19 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, P-STAT-6, SOCS-3 und HSP105 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 3

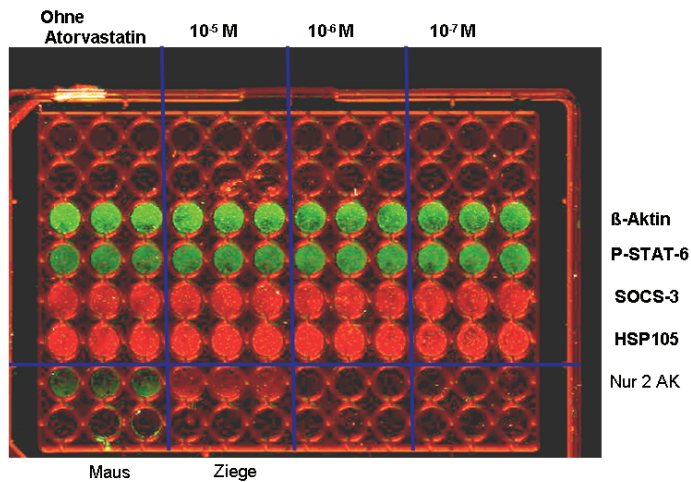


Abb. 20 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, P-STAT-6, SOCS-3 und HSP105 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 4

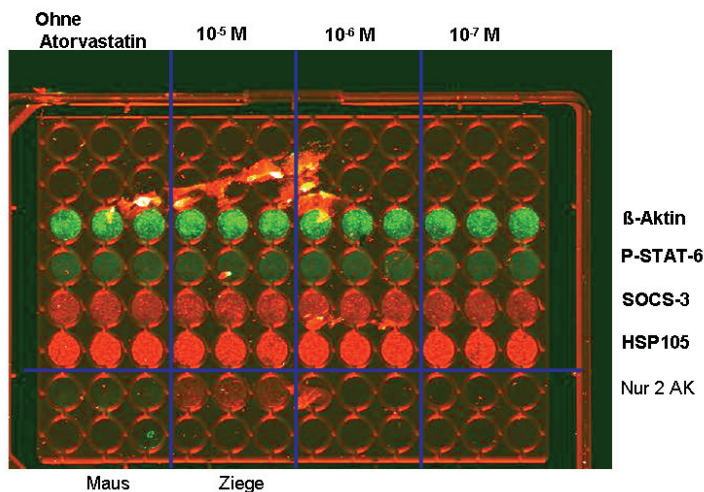


Abb. 21 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, P-STAT-6, SOCS-3 und HSP105 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 5

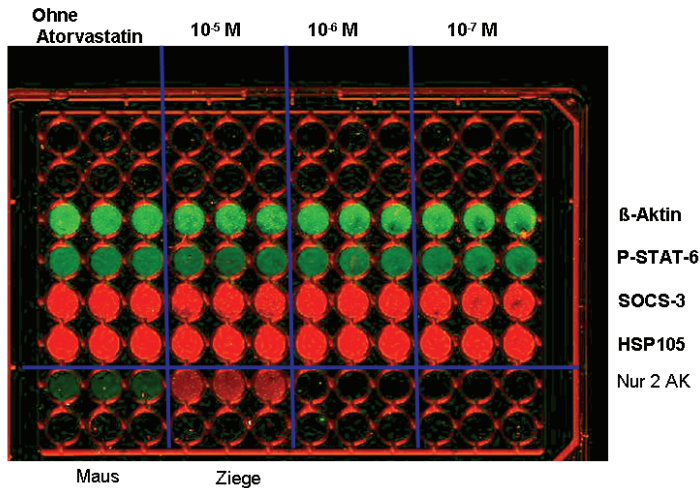


Abb. 22 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, P-STAT-6, SOCS-3 und HSP105 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 6

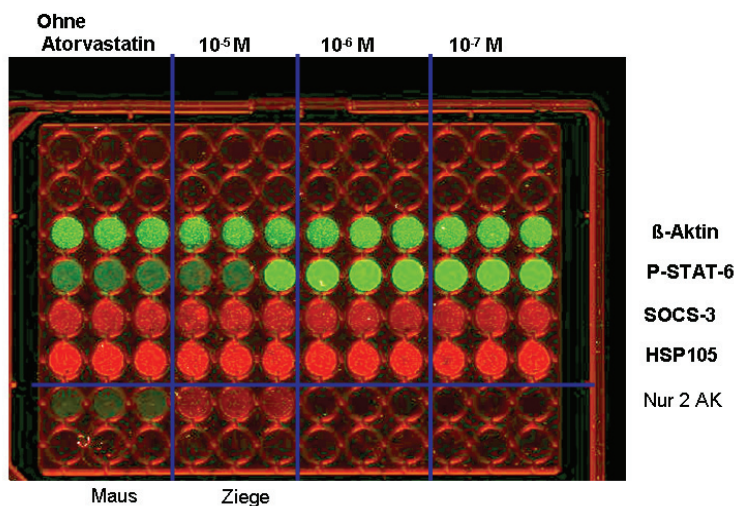


Abb. 23 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, P-STAT-6, SOCS-3 und HSP105 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 7

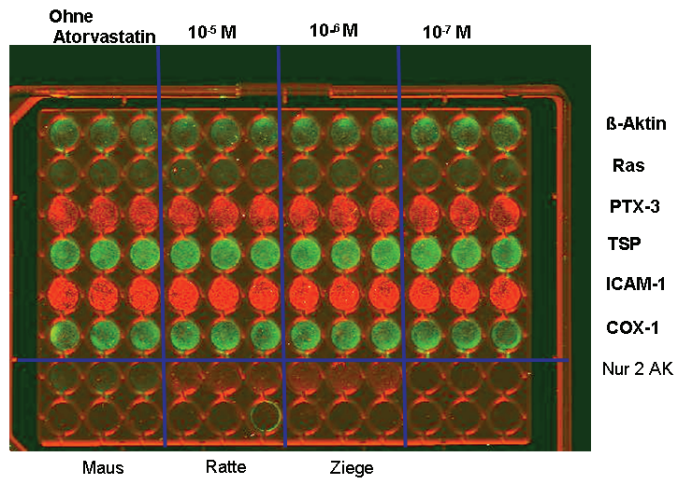


Abb. 24 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, PTX-3, TSP-1, ICAM-1 und COX-1 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 8

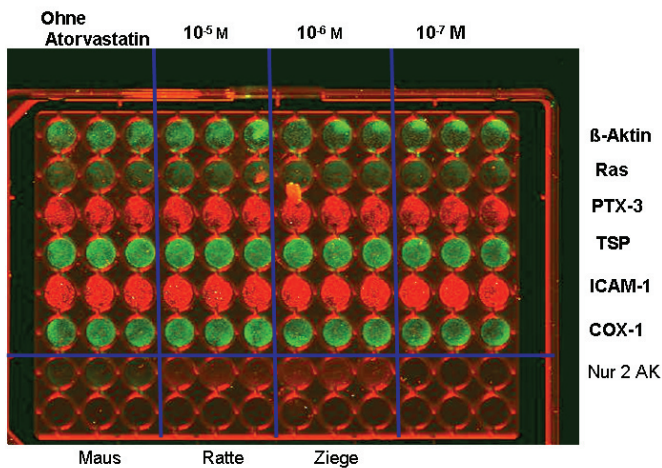


Abb. 25 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, PTX-3, TSP-1, ICAM-1 und COX-1 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 9

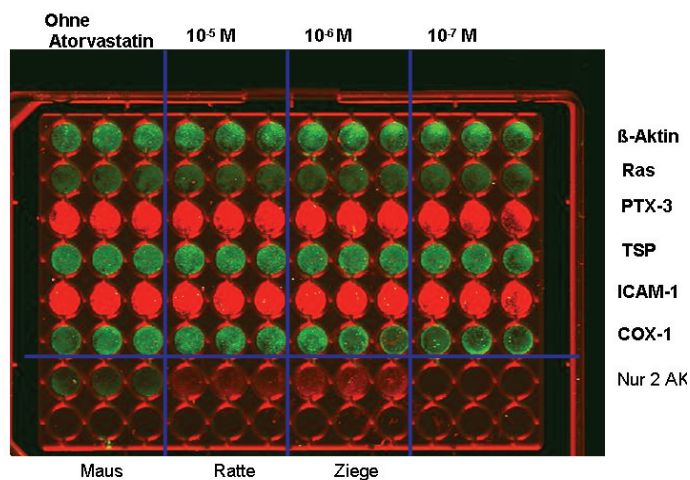


Abb. 26 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, PTX-3, TSP-1, ICAM-1 und COX-1 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte 10

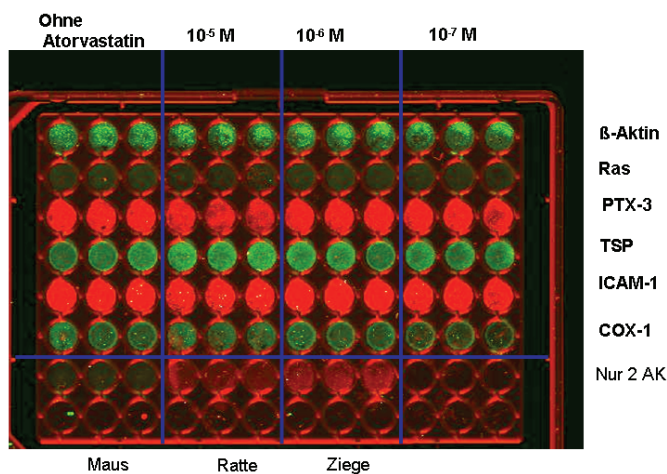


Abb. 27 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, PTX-3, TSP-1, ICAM-1 und COX-1 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte11

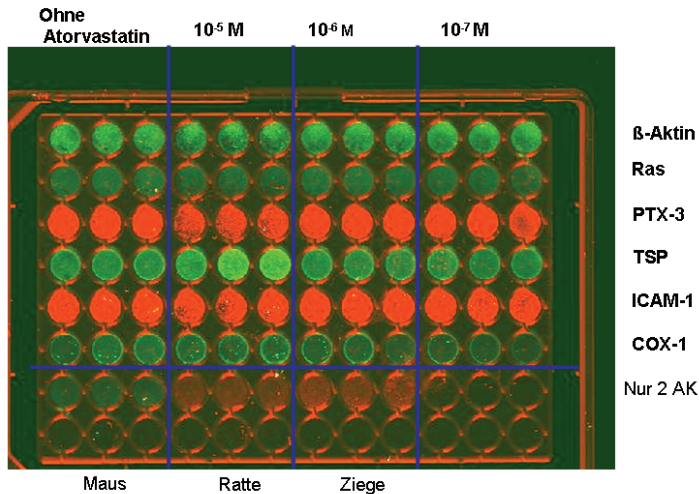


Abb. 28 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, PTX-3, TSP-1, ICAM-1 und COX-1 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 2, Platte12

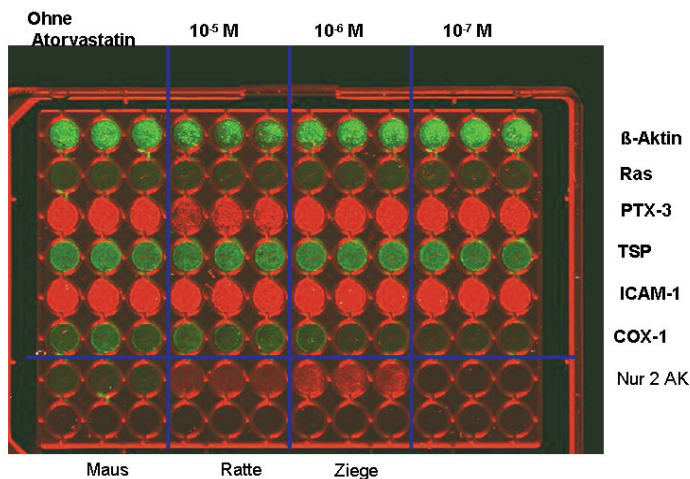


Abb. 29 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, PTX-3, TSP-1, ICAM-1 und COX-1 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 1

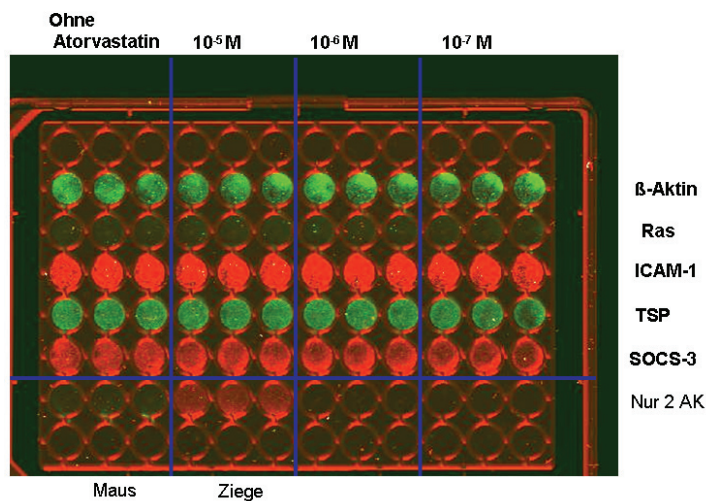


Abb. 30 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1 und SOCS-3, wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 2

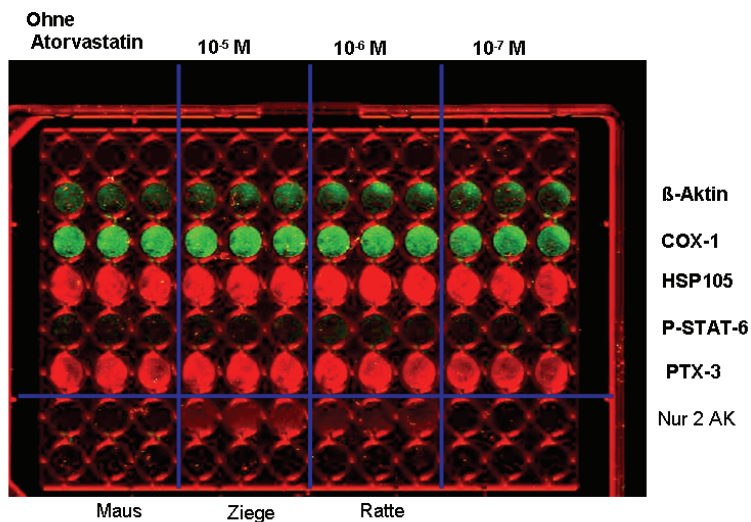


Abb. 31 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, COX-1, HSP105, P-STAT-6 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 3

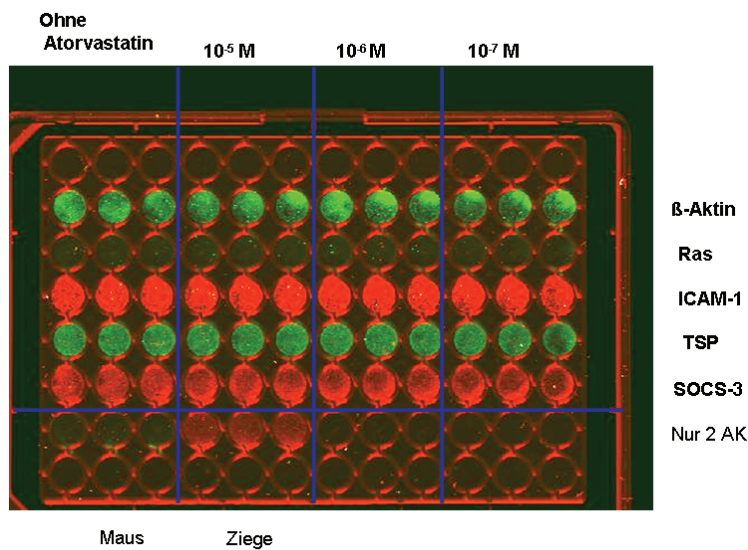


Abb. 32 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1 und SOCS-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 4

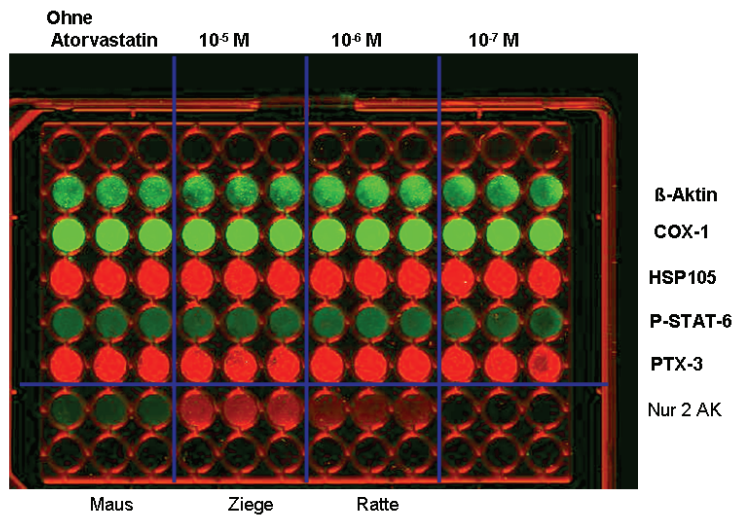


Abb. 33 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, COX-1, HSP105, P-STAT-6 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 5

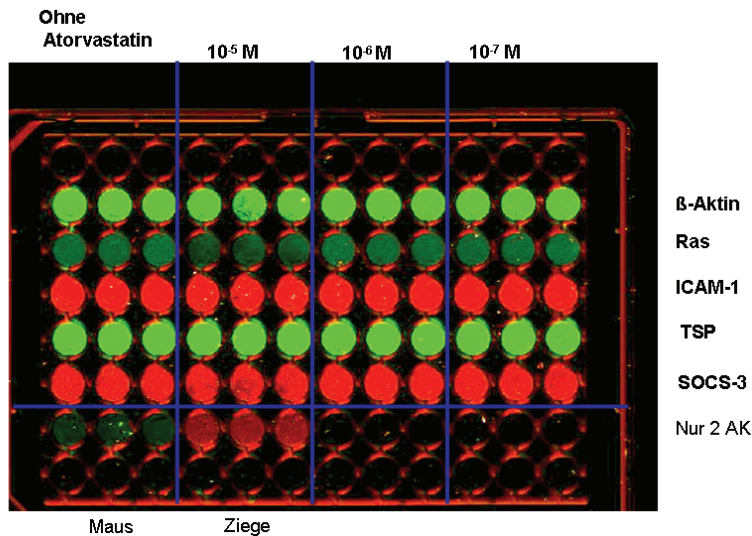


Abb. 34 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1 und SOCS-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 6

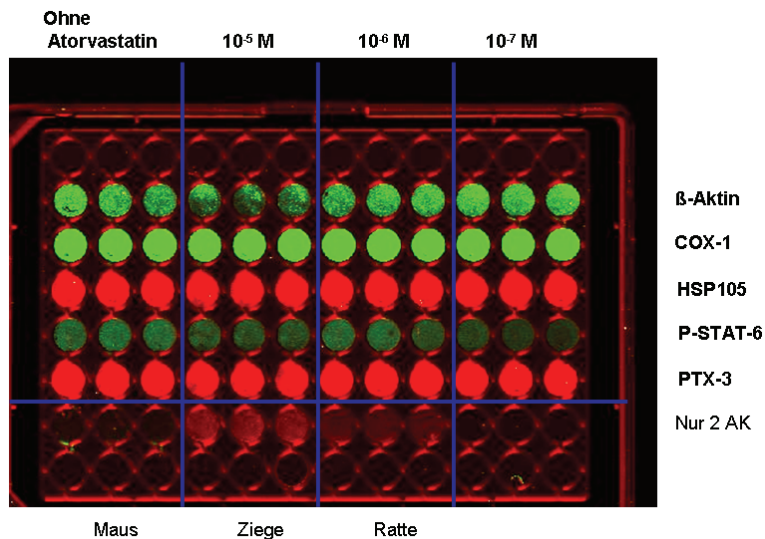


Abb. 35 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, COX-1, HSP105, P-STAT-6 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei permissiver Temperatur von 33°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 7

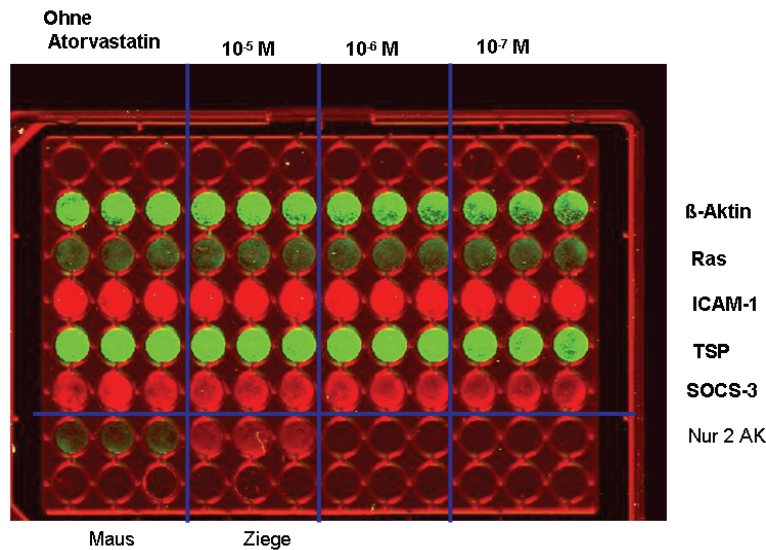


Abb. 36 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1 und SOCS-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 8

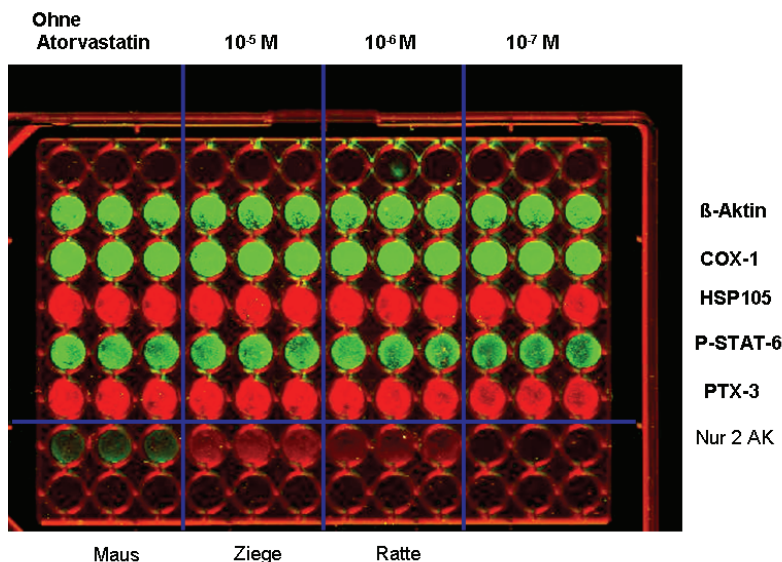


Abb. 37 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, COX-1, HSP105, P-STAT-6 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 9

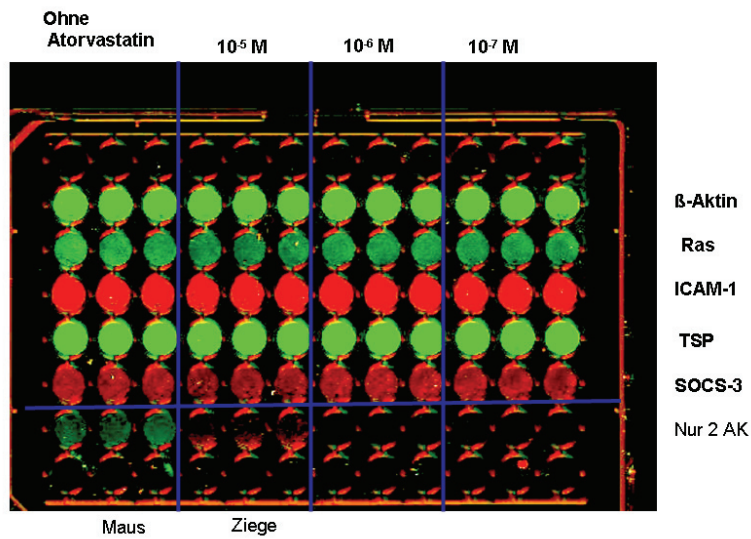


Abb. 38 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1 und SOCS-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 10

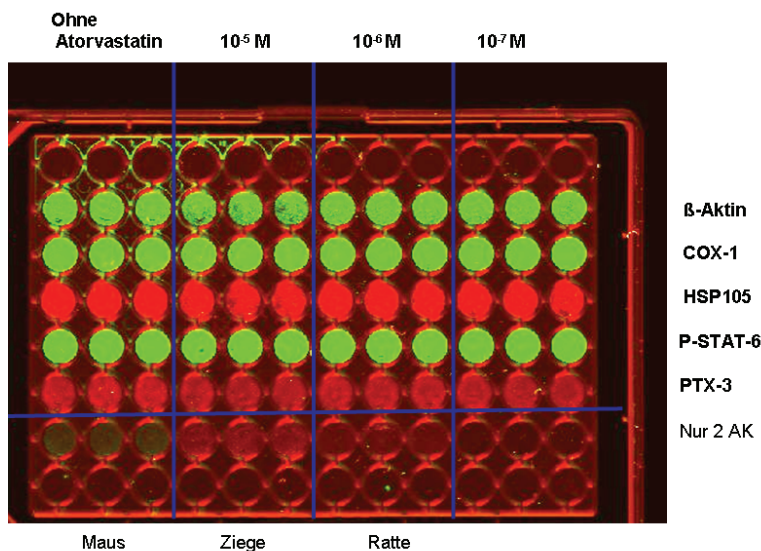


Abb. 39 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, COX-1, HSP105, P-STAT-6 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 11

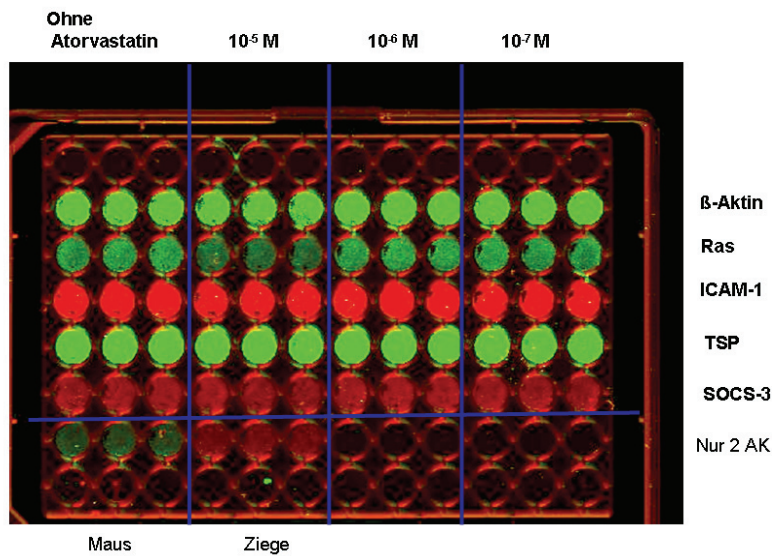


Abb. 40 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, Ras, ICAM-1, TSP-1 und SOCS-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Experiment 3, Platte 12

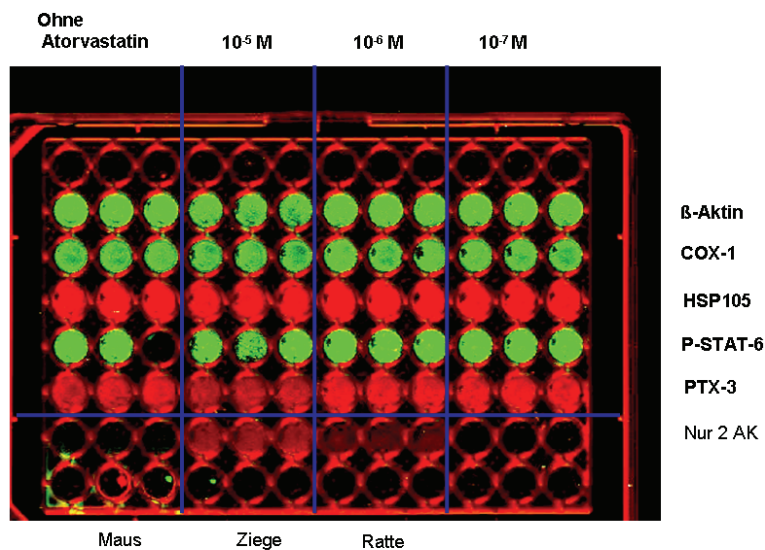


Abb. 41 Darstellung einer 96-Well-Flachbodenplatte. Die Proteine β -Aktin, COX-1, HSP105, P-STAT-6 und PTX-3 wurden in ST14A-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C mit unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) sowie ohne Atorvastatin mittels der In-Zell-Western-Methode untersucht. Die Durchführung der In-Zell-Western-Methode erfolgte wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.

Graphische Darstellungen der Originaldaten von In-Zell-Western-Blot-Experimenten zur Untersuchung des Statineffekts auf die Expressionskinetik Statin-sensitiver Proteine in ST14A-Zellen (mit Ausnahme der Experimente, die keine signifikanten Statineffekte ergaben)

ICAM-1 33°C

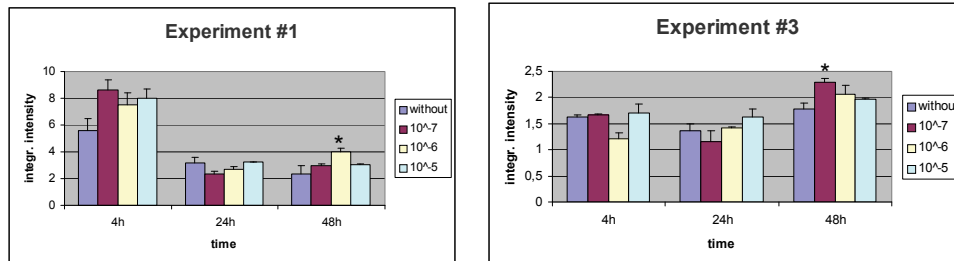


Abb. 42 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von ICAM-1 bei permissiver Temperatur von 33°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10⁻⁷ M (rotbraune Säulen), 10⁻⁶ M (gelbe Säulen) und 10⁻⁵ M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test ermittelt und wie folgt gekennzeichnet: * p< 0,05.

HSP105 33°C

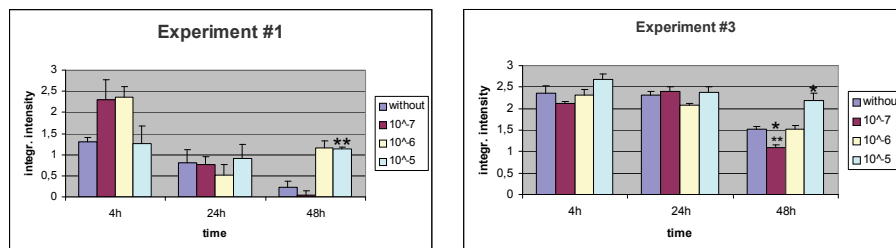


Abb. 43 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von HSP105 bei permissiver Temperatur von 33°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10⁻⁷ M (rotbraune Säulen), 10⁻⁶ M (gelbe Säulen) und 10⁻⁵ M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * p< 0,05, * * p< 0,01 und * * * p< 0,001.

TSP-1 33°C

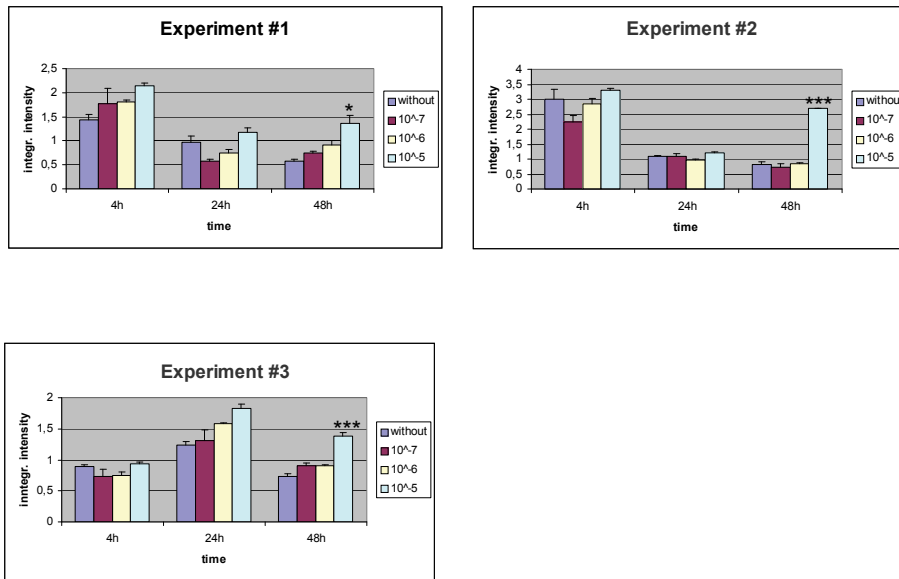


Abb. 44 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von TSP-1 bei permissiver Temperatur von 33°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10⁻⁷ M (rotbraune Säulen), 10⁻⁶ M (gelbe Säulen) und 10⁻⁵ M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * p< 0,05 und * * * p< 0,001.

TSP-1 39°C

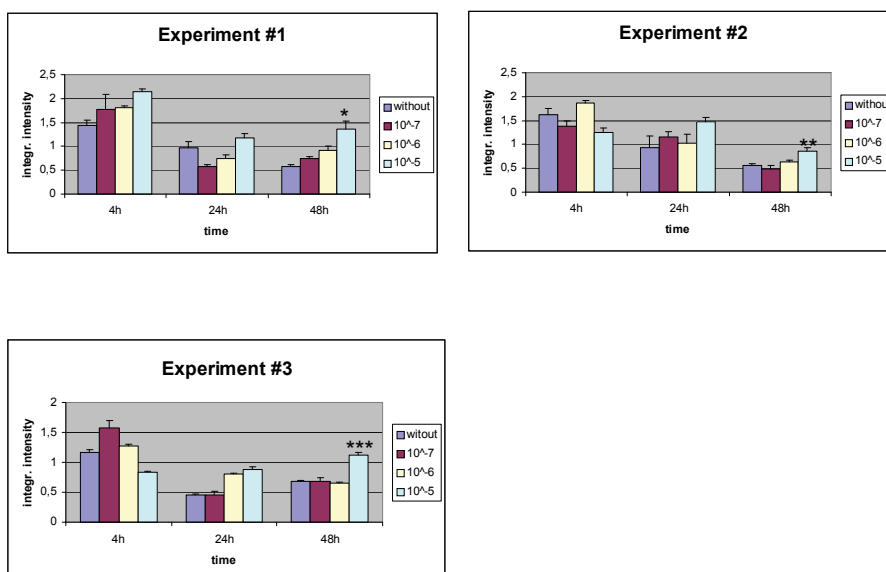


Abb. 45 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von TSP-1 bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C, den

Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säulen), 10^{-6} M (gelbe Säulen) und 10^{-5} M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

PTX-3 39°C

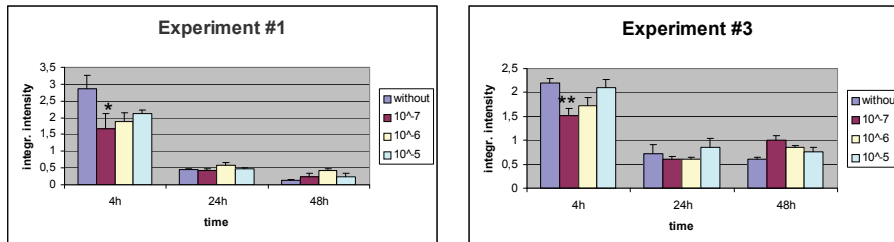


Abb. 46 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von PTX-3 bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säulen), 10^{-6} M (gelbe Säulen) und 10^{-5} M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

SOCS-3 39°C

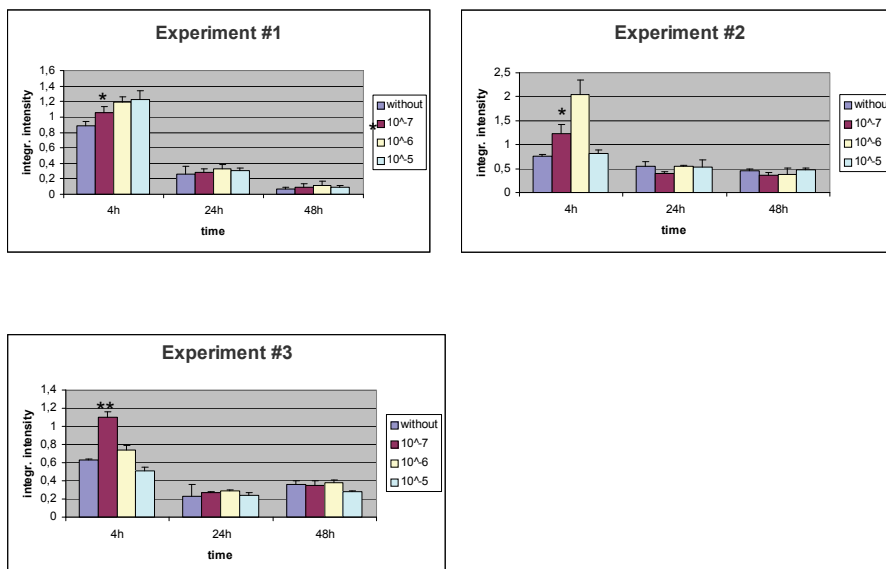


Abb. 47 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von SOCS-3 bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säulen), 10^{-6} M (gelbe Säulen) und 10^{-5} M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante

Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und * * $p < 0,01$.

P-STAT-6 39°C

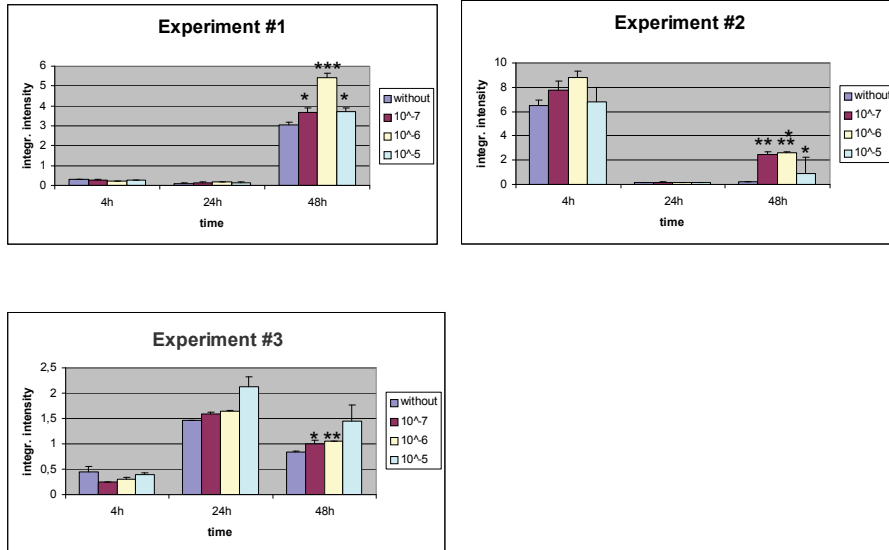


Abb. 48 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von P-STAT-6 bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säulen), 10^{-6} M (gelbe Säulen) und 10^{-5} M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$, * * $p < 0,01$ und * * * $p < 0,001$.

Ras 33°C

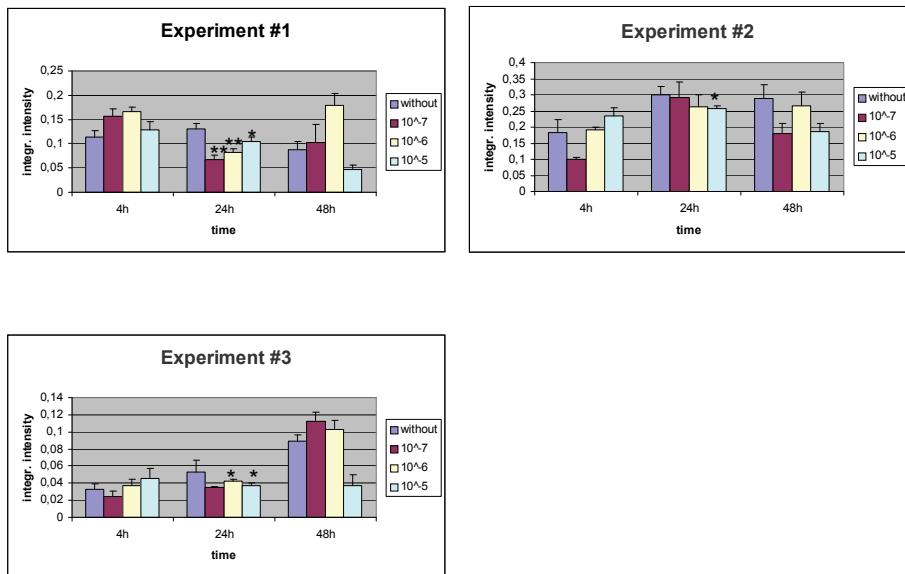


Abb. 49 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von Ras bei permissiver Temperatur von 33°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säulen), 10^{-6} M (gelbe Säulen) und 10^{-5} M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und * * $p < 0,01$.

Ras 39°C

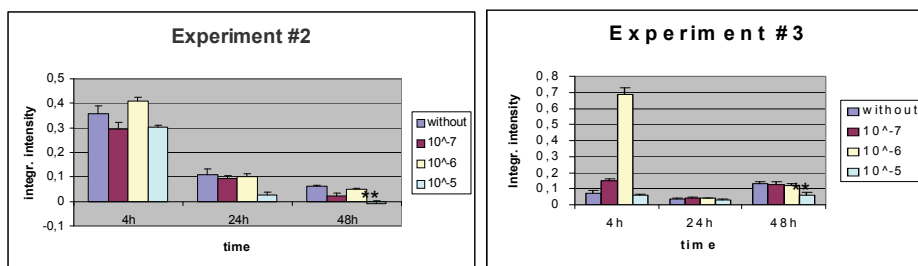


Abb. 50 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von Ras bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säulen), 10^{-6} M (gelbe Säulen) und 10^{-5} M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * * $p < 0,01$.

COX-1 33°C

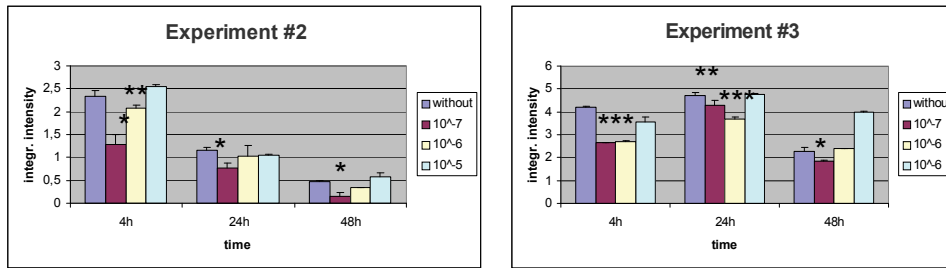


Abb. 51 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von COX-1 bei permissiver Temperatur von 33°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säulen), 10^{-6} M (gelbe Säulen) und 10^{-5} M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

COX-1 39°C

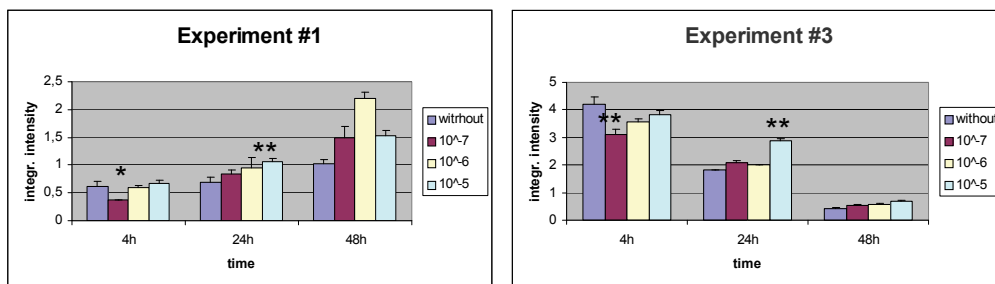


Abb. 52 Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Atorvastatineffekts auf die Expressionskinetik von COX-1 bei nicht-permissiver Temperatur von 39°C, den Expositionszeiten 4 h, 24 h und 48 h und den Atorvastatin-Konzentrationen 10^{-7} M (rotbraune Säulen), 10^{-6} M (gelbe Säulen) und 10^{-5} M (türkisfarbene Säulen) sowie ohne Atorvastatin (blaue Säulen) in ST14A-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten mittels In-Zell-Western-Analyse. Es sind die Ergebnisse der Einzelexperimente wiedergegeben, bei denen signifikante Atorvastatineffekte auftraten. Die Signifikanten Änderungen wurden mittels t-Test überprüft und wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.