

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt der
Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

„Abhängigkeit der Cuprizone-Toxizität von der Applikationsform“

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Gianna Exner
aus Freiburg im Breisgau

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Markus Kipp
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Walter Pfister Prof. Dr. Martin Keschensteiner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Tanja Hochstrasser
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	15.04.2021

Für meine Familie und Freunde

Inhaltsverzeichnis**Abbildungsverzeichnis** **III****Tabellenverzeichnis** **V****Abkürzungsverzeichnis** **VI****1 Einleitung** **1**

1.1 Die Multiple Sklerose 1

1.2 Das Cuprizone-Modell 3

1.3 Fragestellung 7

2 Material und Methoden **9**

2.1 Materialien und Chemikalien 9

2.2 Puffer, Blockseren und Färbelösungen 10

2.3 Versuchstiere 12

2.4 Cuprizone-Modell 12

2.5 Experimentelles Design 12

2.6 Durchführung der Versuche und Materialgewinnung 13

2.7 Färbungen 15

2.7.1 Histochemische Färbungen 15

2.7.2 Immunhistochemische Färbungen 17

2.8 Auswertung 20

2.8.1 Beurteilung der LFB-Färbeintensität / anti-PLP-Immunreaktivität 20

2.8.2 Beurteilung der anti-IBA1- und anti-ALDH1L1-Immunreaktivität 23

2.8.3 Beurteilung der akuten axonalen Schädigung 26

2.8.4 Statistische Auswertung 27

3 Ergebnisse **28**3.1 Geringerer Verlust von PLP und LFB-bindenden Proteinen im *Corpus callosum* nach Fütterung von Cuprizonepellets 28

3.2 Geringere IBA1- Expression im <i>Corpus callosum</i> nach Fütterung von Cuprizonepellets	34
3.3 Vergleichbare ALDH1L1-Expression im <i>Corpus callosum</i> nach Fütterung von Cuprizonepellets	37
3.4 Geringere Sphäroidendichte im <i>Corpus callosum</i> nach Fütterung von Cuprizonepellets	40
<u>4 Diskussion</u>	43
4.1 Der Wirkmechanismus von Cuprizone	43
4.2 Die kontroverse Rolle beteiligter Zellpopulationen und ihr Zusammenspiel	44
4.3 Neurodegeneration im Cuprizone-Modell	47
4.4 Cuprizone als potentielles Toxin für den Menschen	49
4.5 Erklärungsansätze für den Wirkungsverlust von Cuprizonepellets	50
4.6 Einflussfaktoren Cuprizone-induzierter Pathologien	52
<u>5 Zusammenfassung</u>	54
<u>Literaturverzeichnis</u>	55
<u>Danksagung</u>	64
<u>Eidesstattliche Versicherung</u>	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen von multipler Sklerose	1
Abbildung 2: Chemische Strukturformel von Cuprizone	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen.....	13
Abbildung 4: Region 265 und Region 295 in einer frontalen Schnittführung (Sidman et al.) in einer HE-Färbung	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der ABC-Methode	18
Abbildung 6: Demonstration verschieden starker LFB-Färbeintensität im <i>Corpus callosum (CC)</i>	21
Abbildung 7: Demonstration verschieden starker anti-PLP-Immunreaktivität im <i>Corpus callosum (CC)</i>	22
Abbildung 8: Demonstration verschieden starker anti-IBA1-Immunreaktivität im <i>Corpus callosum (CC)</i>	24
Abbildung 9: Demonstration verschieden starker anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im <i>Corpus callosum (CC)</i>	25
Abbildung 10: Nachweis von Sphäroiden mittels einer anti-APPA4-immunhistochemischer Färbung.....	26
Abbildung 11: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf die LFB-Färbeintensität im <i>Corpus callosum (CC)</i> in Region 265	30
Abbildung 12: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf die LFB-Färbeintensität im <i>Corpus callosum (CC)</i> in Region 295	31
Abbildung 13: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von PLP im <i>Corpus callosum (CC)</i> in Region 265.....	32
Abbildung 14: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von PLP im <i>Corpus callosum (CC)</i> in Region 295.....	33

- Abbildung 15:** Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von IBA1 im *Corpus callosum* (CC) in Region 265..... 35
- Abbildung 16:** Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von IBA1 im *Corpus callosum* (CC) in Region 295..... 36
- Abbildung 17:** Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von ALDH1L1 im *Corpus callosum* (CC) in Region 265 38
- Abbildung 18:** Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von ALDH1L1 im *Corpus callosum* (CC) in Region 295 39
- Abbildung 19:** Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf die Sphäroidendichte im *Corpus callosum* (CC) in Region 265 anhand einer anti-APPA4-Färbung ... 41
- Abbildung 20:** Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf die Sphäroidendichte im *Corpus callosum* (CC) in Region 295 anhand einer anti-APPA4-Färbung ... 42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für alternativ angewandte Verabreichungsmöglichkeiten von Cuprizone	7
Tabelle 2: Verwendete Materialien und Chemikalien	10
Tabelle 3: Manuelle Paraffineinbettung	14
Tabelle 4: Aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung mit Xylol zum Eindecken	16
Tabelle 5: Entparaffinierung mit Xylol und absteigende Alkoholreihe.....	17
Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper	19
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper	20
Tabelle 8: Verwendete Isotyp-Antikörper.....	20

Abkürzungsverzeichnis

§	Paragraph
%	Prozent
°C	Grad Celsius
ABC	Avidin-Biotin Komplex (engl. avidin-biotin complex)
ALDH1L1	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member L1
APP	Amyloid Vorläufer Protein (engl. amyloid precursor protein)
APPA4	amyloid beta precursor A4 fusion protein
BHS	Blut-Hirn-Schranke
ca.	circa
CC	Corpus callosum
DAB	Diaminobenzidine
e.d.	gleiche Dosierung (engl. equal dose)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alia
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (engl. fibroblast growth factor 2)
h.d.	höhere Dosierung (engl. high dose)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin Eosin
HIER	heat induced epitope retrieval
IBA1	ionized calcium binding adapter molecule 1
IFN-γ	Interferon gamma
IGF-1	Insulin growth faktor 1
IgG	Immunglobulin G
IL-10	Interleukin 10
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
LFB	Luxol Fast Blue
LPC	Lysolecithin
min	Minute
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose, Encephalomyelitis disseminata
mtDNA	mitochondriale DNA
NAWM	normal erscheinende weiße Substanz (engl. normal appearing white matter)

PAS	<i>Periodic Acid Schiffs</i>
PBS	<i>Phosphatpufferlösung</i>
PET-CT.....	Positronen Emissions Tomographie -Computertomographie
PLP	<i>Proteolipid Protein</i>
PPMS	<i>primär-progrediente MS (engl. primary progressive MS)</i>
RRMS	<i>schubförmig-remittierende MS (engl. relapsing remitting MS)</i>
sog.....	<i>sogenannt</i>
SPMS	<i>sekundär-progrediente MS (engl. secondary progressive MS)</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	<i>Tumornekrose Faktor alpha</i>
ZNS	<i>Zentralnervensystem</i>

1 Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (*Encephalomyelitis disseminata*, MS) ist eine autoimmune chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). In Europa und Nordamerika ist die MS mit einer jährlichen Inzidenz von 2-10 pro 100.000 Personen die häufigste neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter (Nicholas and Rashid 2013). Die grundlegenden klinischen Charakteristika sind Schübe und Progression. Abhängig von ihrem zeitlichen Muster werden drei klinische Verlaufsformen unterschieden – die schubförmig-remittierende (RRMS), die sekundär progrediente (SPMS) und die primär progrediente Form (PPMS) (Abbildung 1). Initial wird mit 85% am häufigsten die RRMS diagnostiziert. Sie ist durch plötzliche neurologische Dysfunktionen, sogenannte Schübe, gefolgt von partieller oder vollständiger Remission gekennzeichnet. Zwischen den aufeinanderfolgenden Schüben findet sich eine sogenannte Plateauphase, in der sich der klinische Zustand nicht verschlechtert. In den meisten Fällen entwickeln Betroffene im Verlauf eine SPMS, was eine progrediente Verschlechterung neurologischer Funktionen ohne Schübe zur Folge hat. Mit 15% deutlich seltener ist die PPMS. Hierbei leiden Erkrankte vom Zeitpunkt der Diagnosestellung unter einer fortschreitenden klinischen Verschlechterung (Keegan and Noseworthy 2002). Die Symptome sind, abhängig von der Lokalisation der Läsionen im ZNS, sehr variabel und können von Sehstörungen, Parästhesien bis Paresen nahezu alle neurologischen Systeme betreffen.

Die Multiple Sklerose (*Encephalomyelitis disseminata*, MS) ist eine autoimmune chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). In Europa und Nordamerika ist die MS mit einer jährlichen Inzidenz von 2-10 pro 100.000 Personen die häufigste neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter (Nicholas and Rashid 2013). Die grundlegenden klinischen Charakteristika sind Schübe und Progression. Abhängig von ihrem zeitlichen Muster werden drei klinische Verlaufsformen unterschieden – die schubförmig-remittierende (RRMS), die sekundär progrediente (SPMS) und die primär progrediente Form (PPMS) (Abbildung 1). Initial wird mit 85% am häufigsten die RRMS diagnostiziert. Sie ist durch plötzliche neurologische Dysfunktionen, sogenannte Schübe, gefolgt von partieller oder vollständiger Remission gekennzeichnet. Zwischen den aufeinanderfolgenden Schüben findet sich eine sogenannte Plateauphase, in der sich der klinische Zustand nicht verschlechtert. In den meisten Fällen entwickeln Betroffene im Verlauf eine SPMS, was eine progrediente Verschlechterung neurologischer Funktionen ohne Schübe zur Folge hat. Mit 15% deutlich seltener ist die PPMS. Hierbei leiden Erkrankte vom Zeitpunkt der Diagnosestellung unter einer fortschreitenden klinischen Verschlechterung (Keegan and Noseworthy 2002). Die Symptome sind, abhängig von der Lokalisation der Läsionen im ZNS, sehr variabel und können von Sehstörungen, Parästhesien bis Paresen nahezu alle neurologischen Systeme betreffen.

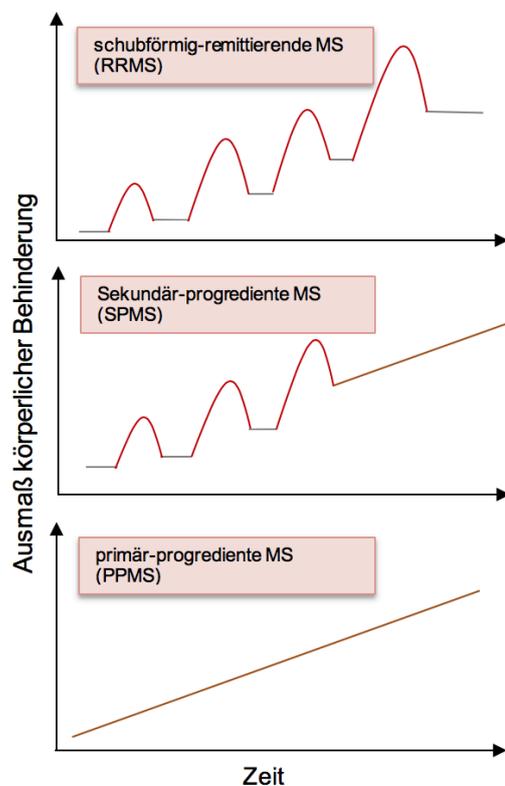


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen von multipler Sklerose

Jahrelange Forschung konnte bereits Zusammenhänge zwischen histopathologischen Veränderungen und dem klinischen Verlauf herstellen. Das entscheidende histopathologische Merkmal der Erkrankung sind fokale Schädigungen der weißen Substanz, sogenannte „sklerotische Plaques oder Läsionen“. Diese sind in erster Linie durch

Jahrelange Forschung konnte bereits Zusammenhänge zwischen histopathologischen Veränderungen und dem klinischen Verlauf herstellen. Das entscheidende histopathologische Merkmal der Erkrankung sind fokale Schädigungen der weißen Substanz, sogenannte „sklerotische Plaques oder Läsionen“. Diese sind in erster Linie durch

Demyelinisierung, geschädigte Axone und rekrutierte Immunzellen gekennzeichnet (Compston and Coles 2002). Dieser fokal entzündliche Prozess beeinflusst die neuronale Integrität und führt letztlich zu axonaler Dysfunktion (Ferguson, Matyszak et al. 1997). Obwohl periphere Immunzellen innerhalb dieser Läsionen zu finden sind, bleibt die Frage nach dem Auslöser der Immunzellinvasion ins ZNS und dem primären Ziel dieser autoimmunen Reaktion offen. Allgemein anerkanntes klinisches Korrelat für diese fokalen akut-entzündlichen Prozesse demyelinisierter Läsionen ist der Schub (Lucchinetti, Bruck et al. 2000, Filippi, Rocca et al. 2012, Popescu and Lucchinetti 2012). Je nach Kompensation axonaler Schädigung durch neuronale Plastizität und Remyelinisierung demyelinisierter Axone kann in der darauffolgenden Remissionsphase eine partielle oder vollständige Regeneration klinischer Symptome eintreten (Irvine and Blakemore 2008, Mei, Lehmann-Horn et al. 2016). Interessanter Weise reduzieren aktuell bestehende Therapiemöglichkeiten zwar die Schubhäufigkeit und Schubintensität, verhindern jedoch nicht die Progression der Erkrankung. So sind die beiden am häufigsten verordneten Medikamente, β -Interferon und Glatirameracetat, bei progredienten Verlaufsformen wie SPMS und PPMS wirkungslos (Panitch, Miller et al. 2004). Eine Klassifikation der MS als rein autoimmune entzündliche Erkrankung ist daher zweifelsohne unzureichend, da es den bedeutsamen neurodegenerativen Krankheitsaspekt unberücksichtigt lässt. Neben den zuvor genannten fokal entzündlichen Läsionen wurden weitere pathogenetische Prozesse entschlüsselt, die in Zusammenhang mit der Progredienz und klinischen Beeinträchtigung stehen. Hierzu gehören Schädigungen der sogenannten normal erscheinenden weißen Substanz (NAWM). NAWM bedeutet, dass weder übliche immunhistochemische Myelinfärbungen noch konventionelle bildgebende Verfahren, wie der Magnetresonanztomografie (MRT), Anomalien feststellen können, obwohl histopathologisch eindeutig Veränderungen nachzuweisen sind. Zu diesen gehören beispielsweise diffuse Gliose, Blut-Hirnschranken (BHS)-Dysfunktionen, Mikrogliaaktivierung und erhöhte Lysosomenanzahlen vor allem in Astrozyten (Evangelou, Esiri et al. 2000, Kutzelnigg, Lucchinetti et al. 2005). Im Gegensatz zur fokalen Läsion sind NAWM-Pathologien diffus und korrelieren bemerkenswerter Weise stärker mit kognitiver Beeinträchtigung und körperlicher Behinderung (Miller, Thompson et al. 2003). Neben Veränderungen der NAWM sind diffuse Schädigungen der grauen Substanz eine weitere Schlüsselkomponente dieses Krankheitsprozesses. Die Pathologien der grauen Substanz können sowohl Kortex als auch subkortikale Regionen und alle Bestandteile eines Neurons betreffen. Insbesondere Schädigungen der grauen Substanz gelten als relevant für die Entstehung von irreversiblen Schäden und Progredienz der Erkrankung (Mallucci, Peruzzotti-Jametti et al. 2015) und werden mit motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen MS-Erkrankter in Verbindung gebracht

(Goldberg, Clarner et al. 2015). Da es sich bei Pathologien der NAWM und grauen Substanz um diffuse Prozesse handelt, können viele Neurone geschädigt werden, was globale Neurodegeneration bedingt und zu irreversibler körperlicher Behinderung führt. Vereinfacht lässt sich also zusammenfassen, dass akut fokal entzündliche Läsionen das Korrelat für Schübe darstellen, während diffuse Schädigung der weißen und grauen Substanz progrediente klinische Verschlechterung bedingen.

Um die exakte Interaktion von Inflammation und Neurodegeneration, sowie das komplexe Ursache-Wirkungskonzept der nachgewiesenen beteiligten Zellpopulationen und Faktoren vollumfassend zu verstehen, stehen der MS-Forschung unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung.

Die MRT mit Kontrastmittelgabe ist insbesondere bei der Diagnosestellung von zentraler Bedeutung und kann Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) im Zuge einer aktiven Entzündung darstellen. Eine Differenzierung zwischen akut aktiven, inaktiven und chronischen Läsionen sowie die Unterscheidung zwischen Demyelinisierung und koexistenten Prozessen, wie Inflammation oder axonalem Schaden, ist jedoch nicht sicher möglich (Lassmann, Bruck et al. 2007, Pittock and Lucchinetti 2007). Obwohl bereits Forschungsarbeiten zur Erweiterung der klinischen Diagnosemöglichkeiten mittels PET-CT (Brugarolas, Reich et al. 2018) existieren, sind Läsionen aktuell mittels rein radiologischer Verfahren nicht hinreichend zu untersuchen (Trapp and Nave 2008). Auch wenn histologische Analysen von humanem Material die einzige Möglichkeit darstellt die MS-Pathologie ganzheitlich zu untersuchen, können aufgrund des Mangels an Autopsiematerial Forschungsarbeiten nicht ausschließlich an Hirngewebe MS-Erkrankter erfolgen. Deshalb haben sich im Laufe der Zeit einige Tiermodelle zur Erforschung der verschiedenen klinischen und pathologischen Aspekte der Erkrankung etabliert. Hierzu gehören virusinduzierte Modelle, wie das Theiler-Murin Enzephalomyelitis-Virus (TMEV), das experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)-Modell und Toxin-basierte Modelle, wie das Lysolecithin (LPC)-Modell und das Cuprizone-Modell. Obwohl Tiermodelle lediglich Teilaspekte der Erkrankung abbilden und gewonnene Erkenntnisse nur eingeschränkt auf MS-Pathologien übertragbar sind, bleiben Tiermodelle in der heutigen MS-Forschung bedeutsam.

1.2 Das Cuprizone-Modell

Im Rahmen dieser Studie wurde das Cuprizone-Modell verwendet, welches zusammen mit dem LPC- und Ethidiumbromid-Modell den „toxisch-demyelinisierenden Modellen“ zugeordnet wird. Was ist Cuprizone und wie hat es sich zu einem wichtigen Tiermodell in der MS-Forschung etabliert?

Das Toxin Cuprizone (bis-(cyclohexanone) oxaldehydrozone) wurde erstmalig im Jahr 1950 von Gustav Nilson beschrieben. Er stellte fest, dass das Kondensationsprodukt aus Oxalhydrazide und Cyclohexanone, genannt Cuprizone, bei einer Komplexbildung mit Kupfersalzen eine blaue Farbreaktion auslöst (Nilsson 1950). Aufgrund der Kupfer-Cuprizone-Komplexbildung wurde Cuprizone initial zur quantitativen Bestimmung von Kupfer verwendet. Die erste biomedizinische Verabreichung erfolgte erst Jahre später. Hier wurden nach Cuprizonegabe bei Mäusen, Ratten und Meerschweinchen sowohl reproduzierbar niedrige Kupferspiegel als auch Demyelinisierung begleitet von Ödemen und *Hydrocephalus* beobachtet (Carlton 1966, Carlton 1967, Carlton 1969). Im Jahr 1998 veröffentlichten Hiremath und seine Kollegen eine Studie mit dem Ziel die Variabilität der Cuprizone-induzierten Pathologien auf ein Minimum zu reduzieren. Bei acht bis zehn Wochen alten C57BL/6 Mäusen, einer Cuprizonedosis von 0,2% in gemahlenem Haltungsfutter und einer Expositionsdauer von fünf bis sechs Wochen ließ sich eine reproduzierbare vollständige Demyelinisierung des *Corpus callosums* (CCs) bei geringer Mortalität der Versuchstiere erzielen (Hiremath, Saito et al. 1998).

Läsionen nach Cuprizoneintoxikation beschränken sich, entgegen anfänglicher Annahmen, nicht auf die weiße Substanz (*mediales Corpus callosum und Pedunculus cerebellaris superior*), sondern betreffen auch einige Bereiche der grauen Substanz wie Kortex (Kipp and Baumgartner 2011), *Cerebellum* (Groebe, Clarner et al. 2009) und Basalganglien (Norkute, Hieble et al. 2009). Bedeutsam für die Erforschung möglicher therapeutischer Ansatzpunkte war die Beobachtung, dass die toxisch induzierte Demyelinisierung reversibel ist. Wird nach fünf- bis sechswöchiger Cuprizoneintoxikation, auch „akute Demyelinisierung“ genannt, die Cuprizoneintoxikation beendet, folgt eine spontane Remyelinisierung (Torkildsen, Brunborg et al. 2008, Ghaiad, Nooh et al. 2016). Bei Verlängerung der Intoxikationsdauer auf über 12 Wochen finden Remyelinisierungsprozesse nur noch eingeschränkt statt oder fallen vollständig aus (Ludwin 1980, Lindner, Fokuhl et al. 2009), sodass man von „chronischer Demyelinisierung“ spricht. Cuprizone führt nicht nur zu einer frühen und schwerwiegenden Schädigung von Oligodendrozyten mit konsekutiver Demyelinisierung, sondern auch zu Mikrogliaaktivierung, Astrozytose und ausgeprägter axonaler Schädigung (Ludwin 1978, Matsushima and Morell 2001, Vakilzadeh, Khodagholi et al. 2015, Kipp 2016). All diese Veränderungen spiegeln wichtige Teilaspekte der MS wider, sodass sich das Cuprizone-Modell zu einem wertvollen Hilfsmittel für Untersuchungen der komplexen MS-Pathologie etabliert hat (Werner, Saha et al. 2010, Chen, Chen et al. 2015, Vakilzadeh, Khodagholi et al. 2016, Tejedor, Wostradowski et al. 2017).

Interessanterweise konnte das physikochemische Verhalten von Cuprizone, trotz relativ einfacher Strukturformel (Abbildung 2) und jahrelanger Verwendung nicht abschlie-

ßend geklärt werden. Seit der Entdeckung des Toxins im 20. Jahrhundert wurden Interaktionen mit dem Kupferhaushalt angenommen. Einige Forschungsgruppen gingen davon aus, dass Cuprizone selbst physiologische Barrieren nicht überwinden und ins Gehirn gelangen kann und seine toxische Wirkung auf einen Kupfermangel zurückzuführen ist. Dieser entsteht beispielsweise durch Chelatierung (Rossi, Lombardo et al. 2004). Andere zeigten,

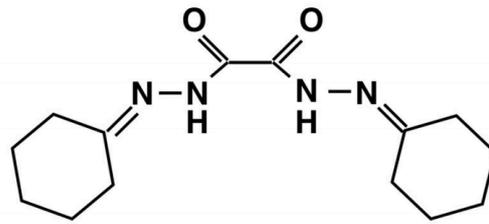


Abbildung 2: Chemische Strukturformel von Cuprizone

dass die Toxizität von Cuprizone durch Kupferzugabe nicht reduziert wird (Carlton 1967) und eine milde neunmonatige Cuprizoneintoxikation bei Mäusen zu einem Anstieg der Kupferkonzentration im Gehirn führt (Zatta, Raso et al. 2005).

Kupfer spielt als Kofaktor einiger Enzyme eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse. Morphologische Veränderungen von Mitochondrien nach Cuprizoneintoxikation wurden bereits im Jahr 1969 beschrieben. Die von unterschiedlichen Forschungsgruppen nachgewiesenen intrahepatischen „Riesenmitochondrien“ waren trotz reduzierter Größe und Anzahl der enthaltenden Cristae in ihrem Durchmesser um ein Vielfaches vergrößert (Suzuki and Kikkawa 1969, Hoppel and Tandler 1973, Wagner and Rafael 1977). Dass die Funktionsfähigkeit des morphologisch veränderten Zellorganells beeinträchtigt ist, wird durch den Nachweis inhibierter mitochondriale Enzyme, wie Cytochromoxidasen gestützt. Neben intrahepatisch vergrößerten Mitochondrien konnten auch in Oligodendrozyten „Riesenmitochondrien“ nachgewiesen werden (Blakemore 1972). Einige Forschungsgruppen gingen davon aus, dass Cuprizone durch mitochondriale Dysfunktionen oxidativen Stress (Venturini 1973, Zatta, Raso et al. 2005) in Oligodendrozyten auslöst, welcher zu Zelltod und Demyelinisierung führt (Matsushima and Morell 2001). Störungen der Kupferhomöostase sind bei bereits aus anderen Erkrankungen des neurodegenerativen Formenkreises wie dem Menkes-Syndrom und Morbus Wilson (Strausak, Mercer et al. 2001) bekannt.

Das Cuprizone-Modell bietet eine wesentliche Grundlage zur Erforschung molekular-kinetischer Mechanismen während der De- und Remyelinisierung, um mögliche Therapieansätze zu identifizieren. In den letzten Jahren hat sich das Tiermodell zudem für Untersuchungen an diffusen Gewebeeränderungen der weißen und grauen Substanz bewährt. Teile des *Corpus Callosums*, die *Hippocampus-Fimbria*-Region oder die *Commissura anterior* zeigten nach Cuprizoneintoxikation NAWM-typische Veränderungen; das heißt Mikrogliaaktivierung und Oligodendrozytenstress bei lediglich geringfügiger Demyelinisierung (Groebe, Clarner et al. 2009, Kipp, Norkus et al. 2011).

Kürzere apikale Dendriten kortikaler Pyramidenzellen nach chronischer Demyelinisierung sowie fortschreitende axonale Degeneration nach abgeschlossener Remyelinisierung durch Cuprizoneintoxikation (Manrique-Hoyos, Jurgens et al. 2012, Hamada and Kole 2015) geben eindeutige Hinweise, dass auch neurodegenerative Aspekte mit dem Cuprizone-Modell untersucht werden können. Insbesondere für Forschungen zu Remyelinisierungsprozessen, jedoch auch für Arbeiten zu diffusen Veränderungen der weißen und grauen Substanz sowie neurodegenerativen Aspekten ist eine reproduzierbare und prognostizierbare Demyelinisierung zuvor notwendig (Zendedel, Beyer et al. 2013, Kipp 2016). Wie zuvor erwähnt, begannen Hiremath und Kollegen bereits früh mit dem Versuch die Variabilität Cuprizone-induzierter Pathologien zu minimieren. Das von ihnen vorgeschlagene Studiendesign wurde für die meisten darauffolgenden Experimente verwendet. Im Laufe der Jahrzehnte konnten viele weitere einflussnehmende Variablen auf Cuprizone-induzierte Veränderungen nachgewiesen werden. So zeigt beispielsweise der caudale Anteil des CCs und der dorsale Bereich des *Hippocampus* eine höhere Anfälligkeit für Demyelinisierung als der rostrale Teil des CCs und der *Pedunculus cerebellaris* (Sideworthy et al. 2003). Neben Lokalisation ist das Geschlecht von Bedeutung. Die Auswirkung geschlechtsspezifischer Hormone auf Prädisposition und Schweregrad der Erkrankung ist vielfach beschrieben worden (Confavreux, Hutchinson et al. 1998, Antonio, Patrizia et al. 2008, Acs, Kipp et al. 2009). Exemplarisch kann 17 β -Estradiol und Progesteron und ihr protektiver Einfluss auf Demyelinisierungsprozesse genannt werden (Acs, Kipp et al. 2009). Die bereits von Hiremath und Kollegen postulierte Relevanz des Alters der Versuchstiere wurde in folgenden Forschungsarbeiten detaillierter untersucht. Juvenile Mäuse zeigten eine schnellere Demyelinisierung, raschere Remyelinisierung und geringeren axonalen Schaden als adulte Tiere (Pfeifenbring, Nessler et al. 2015, Gingele, Henkel et al. 2020). Zudem schienen Mikroglia Alterungsprozesse zu durchlaufen, welche ihre Reaktion auf Demyelinisierungsprozesse verändern. Bei zwei Monate alten Mäusen war im Vergleich zu adulten Tieren eine intensivere und andauerndere Mikrogliaaktivierung zu beobachten (Klein, Mrowetz et al. 2018).

Auch wenn die meisten Autoren nach Cuprizoneintoxikation eine reproduzierbare und signifikante Demyelinisierung von einigen Bereichen der weißen und grauen Substanz im Gehirn der Versuchstiere nachwiesen (Blakemore 1972, Skripuletz, Bussmann et al. 2010, Schmidt, Awad et al. 2013, Goldberg, Clarner et al. 2015, Wagenknecht, Becker et al. 2016), bestehen hierzu auch kontroverse Ansichten. Diese Forschungsgruppen zeigten, dass Axone zwar zu erwartende Myelinschädigungen aufweisen, sich das Ausmaß myelinisierter und demyelinisierter Axone zwischen den Versuchstieren jedoch unterscheidet. Aufgrund dieser Variabilität der toxisch induzierten Demyelinisie-

rung halten sie das Cuprizone-Modell für ungeeignet, um biologische Vorgänge der Remyelinisierung valide zu untersuchen (Stidworthy, Genoud et al. 2003).

Bei genauer Betrachtung der zahlreichen Arbeiten mit dem Toxin fällt neben den genannten Faktoren ein weiterer möglicher Grund für unterschiedliche Studienergebnisse auf – die Applikationsform. Nicht alle Forschungsgruppen verabreichten Cuprizone auf die gleiche Art und Weise. Neben der weit verbreiteten pulverisierten Form des Toxins kamen auch alternative Applikationsformen zur Anwendung (Tabelle 1). Zu nennen sind hier Cuprizone-enthaltende Pellets (Carey and Freeman 1983, Soundarapandian, Selvaraj et al. 2011, Steelman, Thompson et al. 2012), Cuprizone-enthaltendes Trinkwasser (Zatta, Raso et al. 2005) oder die Verabreichung von aufgelöstem Cuprizone als Sondennahrung (Zhen, Liu et al. 2017). Bemerkenswerterweise wurde die Effektivität dieser Verabreichungsmöglichkeiten nicht vergleichend untersucht und könnte als weiterer beeinflussender Faktor der kritisierten Variabilität in Frage kommen.

Autor	Journal und Jahr	Dosis und Applikationsform	Fütterungsdauer	Geschlecht, Alter und Stamm der Versuchstiere
Steelman et. al	Neuroscience Research, 2011	0,2% Cuprizonepellet	5 Wochen	7 Wochen alte, männliche C57BL/6-Mäuse
Soundarapandian et. al.	Scientific Reports, 2012	0,2% Cuprizonepellet	5 Wochen	C57BL/6-Mäuse
Zatta et.al.	Cellular and Molecular Life Sciences, 2005	0,2% Cuprizone-enthaltendes Trinkwasser	9 Monate	Männliche CD-Mäuse
Zhen et. al.	ASN Neuro, 2017	gewichtsadaptierte Cuprizone-enthaltende Sondennahrung	5 Wochen	10 Wochen alte männliche C57BL/6-Mäusen

Tabelle 1: Beispiele für alternativ angewandte Verabreichungsmöglichkeiten von Cuprizone

1.3 Fragestellung

Das Cuprizone-Tiermodell wird in erster Linie für Untersuchungen von De- und Remyelinisierungsprozessen ohne T-Zellbeteiligung verwendet (Ludwin 1978, Gudi, Gingele et al. 2014).

Eine sichere Reproduzierbarkeit und prognostizierbare Kinetik von De- und Remyelinisierung im Tiermodell ist entscheidend, um die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen sicherzustellen und mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Obwohl für zahlreiche Faktoren wie Geschlecht, Alter, Gewicht, Stress, Toxinepositions-dauer und Toxindosis ein beeinflussender Effekt auf Cuprizone-induzierte Pathologien nachgewiesen ist, sind bislang keine Studien erfolgt, welche die Applikationsformen auf Unterschiede untersucht.

Die vorliegende Studie vergleicht daher die Effektivität der häufigsten Applikationsformen (Pulver und Pellets) in Bezug auf Ausmaß und Reliabilität von Demyelinisierung, Mikrogliaaktivierung, Astrozytenaktivierung und akutem axonalen Schaden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A2153
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich	15307
Cuprizone (Bis-(cyclohexanone)oxaldihydrazone)	Sigma-Aldrich	C9012
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)+ Chromogen	Dako	K3468
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)+ Substrat Puffer	Dako	K3468
Di-Natriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Merck Millipore	106559
DPX Eindeckmedium	VWR Prolabo	360292F
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth	8043.2
Elite ABC-Kit	Vectastain	PK-6100
Eosin	Merck Millipore	15935
Essigsäure 100 %	Merck Millipore	100063
Ethanol 100 %	Merck Millipore	100983
Fischgelatine (Cold fish skin gelatine)	Sigma-Aldrich	G7041
Formaldehyd 37 %	Roth	P733.2
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	H3136
Aluminiumkaliumsulfat Dodecahydrat	Merck Millipore	101042
Lithiumcarbonat	Merck Millipore	105671
Luxol Fast Blue MBS	Chroma	M146-F
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	Merck Millipore	106346
Natriumhydroxid	Merck Millipore	HC809730

Natriumiodat	Merck Millipore	106525
Natronlauge	Merck Millipore	109137
Normales Ziegenserum (Normal Goat Serum)	Vector	S-1000
Paraffin	Leica Biosystems Paraplast	39602012
PBS Dulbecco-Pulver (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)	Biochrom	L-182-50
Perjodsäure	Merck Millipore	100524
Salzsäure	Roth/ Merck	K025.1 / 1.09057
Schiffsreagenz	Sigma-Aldrich	3952016
Tris (PUFFERAN)	Roth	4855.2
Tween 20	Sigma-Aldrich	P1379
Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2)	Roth	8070.4
Xylol	VWR Chemicals	1330-20-7
Zitronensäure	Roth	X863.2
Zitronensäure Monohydrat	Merck Millipore	100244

Tabelle 2: Verwendete Materialien und Chemikalien

2.2 Puffer, Blockseren und Färbelösungen

PBS 1x Fertiglösung:

- 47,75g PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- 5l destilliertes Wasser
- pH 7,4

Tris-EDTA-Puffer:

- 6.05g Tris
- 1,85g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat
- 5l destilliertes Wasser
- pH 9,0

<u>Blockserum für APPA4:</u>	<ul style="list-style-type: none">- 2ml Normales Ziegenserum- 1g Bovine serum albumin- 0,1g Fischgelatine- 500µl Tween 20- 98ml PBS- pH 7,4
<u>Blockserum für alle anderen Antikörper</u> <u>(5% Normales Ziegenserum):</u>	<ul style="list-style-type: none">- 2,5ml Normales Ziegenserum- 47,5ml PBS
<u>Hämatoxylinlösung:</u>	<ul style="list-style-type: none">- 1g Hämatoxylin- 1000ml destilliertes Wasser- 200mg Natriumjodat- 50g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat- 50g Chloralhydrat- 1g Zitronensäure Monohydrat
<u>0,1 % Eosinlösung:</u>	<ul style="list-style-type: none">- 1g Eosin- 100ml destilliertes Wasser (vor Gebrauch wird 1:10 weiter verdünnt und 1 Tropfen Essigsäure pro 100ml Lösung zugegeben)
<u>0,1 % Luxol Fast Blue Lösung:</u>	<ul style="list-style-type: none">- 0,1g Luxol fast blue MBS- 100ml 96% Ethanol- 0,5ml 100% Essigsäure
<u>0,05 % Lithiumcarbonatlösung:</u>	<ul style="list-style-type: none">- 0,05g Lithiumcarbonat- 100ml destilliertes Wasser
<u>0,5 % Perjodsäurelösung:</u>	<ul style="list-style-type: none">- 0,5g Perjodsäure- 100ml destilliertes Wasser
<u>Perfusionslösung/ Fixierlösung:</u>	<ul style="list-style-type: none">- 100ml Formaldehyd (37%)- 900 ml destilliertes Wasser- 4,6g Natriumdihydrogenphosphat (wässrig)- 8,0g Dinatriumhydrogenphosphat
<u>0,3 % Wasserstoffperoxidlösung:</u>	<ul style="list-style-type: none">- 1ml H₂O₂ (30%)- 99ml PBS

2.3 Versuchstiere

Für diesen Versuch wurden zwanzig acht Wochen alte männliche Mäuse des Stammes C57BL/JRj6 (Janvier, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden jeweils zu fünf in einem Käfig (Typ II long) gehalten, der regelmäßig gewechselt wurde. Die Haltung erfolgte bei einer Raumtemperatur von 20-24°C und einem hell: dunkel Zyklus von 13: 11 Stunden. Unter Gewährleistung einer regelmäßigen Luftzirkulation wurde die Luftfeuchtigkeit konstant zwischen 40% und 60% gehalten.

Alle geltenden Tierschutzbestimmungen und internationalen Richtlinien bei Tierversuchen wurden eingehalten. Eine Genehmigung für die Durchführung von Tierversuchen gemäß § 8 Tierschutzgesetz lag durch die Regierung von Oberbayern vor (Tierversuchsgenehmigung: 55.2-1-54-2532-73-15).

2.4 Cuprizone-Modell

Für diese Arbeit wurde das Modell der toxisch induzierten Demyelinisierung durch die Fütterung des Kupferchelators Cuprizone verwendet. Es handelt sich um ein geeignetes Tiermodell, um Demyelinisierung, Remyelinisierung und frühe, selektive Oligodendrozytenapoptose aufzuzeigen (Groebe, Clarner et al. 2009). Cuprizone induziert Demyelinisierung vorrangig in der Mitte des CCs und den medialen Abschnitten des *Cingulum*s (T. Schmidt, M. Kipp, 2012). Astrogliose und Mikrogliose stellen weitere Cuprizone-induzierte zelluläre Veränderungen dar (Groebe, Clarner et al. 2009).

2.5 Experimentelles Design

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die histopathologischen Veränderungen einer Fütterung mit Cuprizonepellets in gleicher (equal dose = e.d.; 0,3% Cuprizone) oder höherer (high dose = h.d.; 0,4% Cuprizone) Dosierung, mit denen der herkömmlichen Applikationsform (Pulver; 0,25% Cuprizone) vergleichbar sind.

Dafür wurden die Mäuse in vier Gruppen mit jeweils fünf Tieren eingeteilt und über drei Wochen nach verschiedenen Fütterungsprotokollen gefüttert (Abbildung 1). Nach der Entnahme der Gehirne wurden die verschiedenen Gruppen in Bezug auf das Ausmaß von Demyelinisierung, Mikrogliose, Astrogliose und akutem axonalen Schaden verglichen.

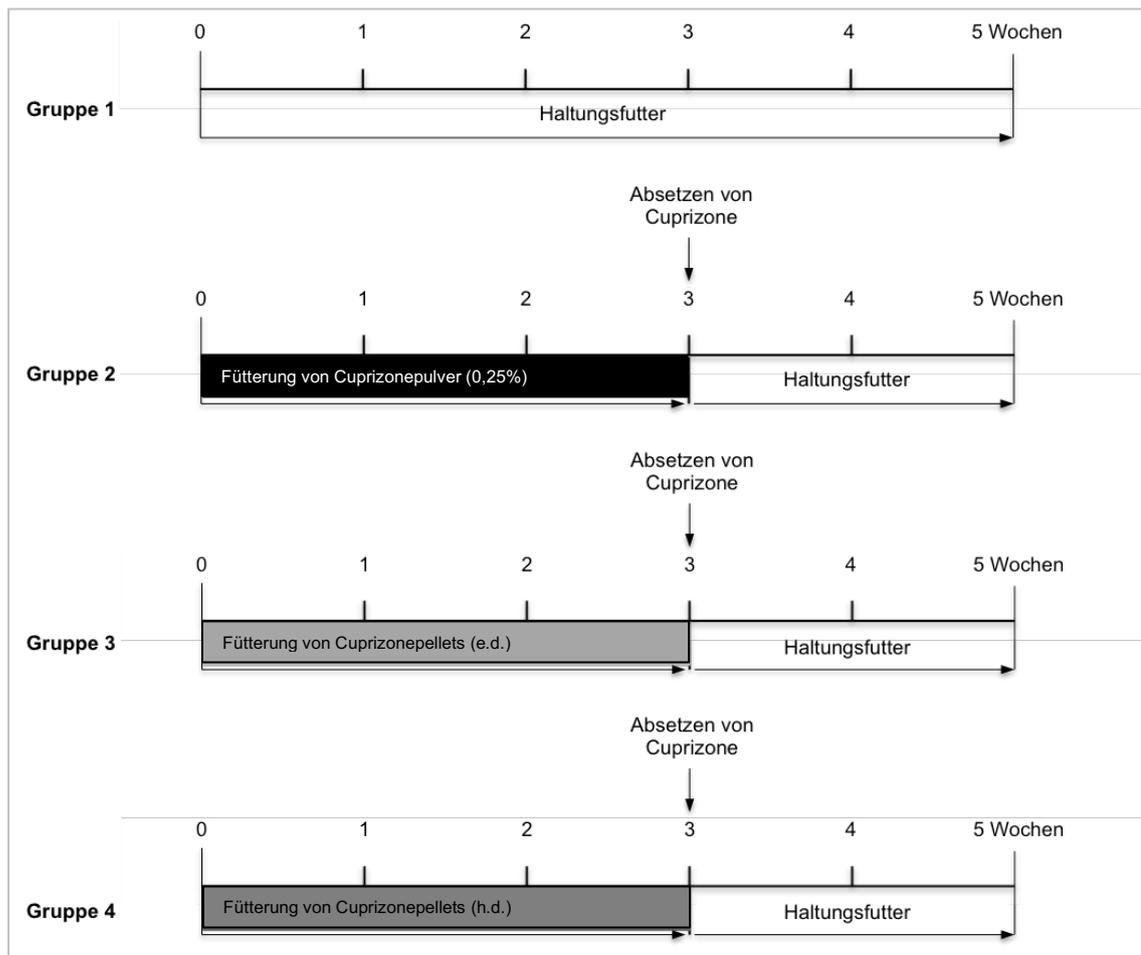


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen

2.6 Durchführung der Versuche und Materialgewinnung

Die Versuche wurden mit acht Wochen alten männlichen C57BL/JRj6 Mäusen in der Tierhaltung (Physiologikum der LMU, München) durch die Mitarbeiter der Neuroanatomie durchgeführt. Der Versuchsbeginn erfolgte nach einer einwöchigen Gewöhnungsphase mit Haltungsfutter. Gruppe 1 erhielt weiterhin handelsübliches Haltungsfutter und stellte die Kontrollgruppe dar. Für Gruppe 2 wurde das Cuprizonefutter (0,25%) eigenhändig hergestellt. Mit einer Präzisionswaage wurden zunächst 0,5g Cuprizone abgewogen und mit 200g gemahlenem Haltungsfutter in einer handelsüblichen Küchenmaschine (Kult X, WMF Group, Geislingen an der Steige, Germany) vermengt. Das Mischen des Futters erfolgte auf niedriger Stufe für eine Minute. 100g der Cuprizone-Haltungsfutter-Mischung wurden auf zwei Petri-Schalen verteilt und in den Käfig gelegt. Die übrig gebliebene Hälfte der Mischung wurde bei 4°C für den folgenden Tag aufbewahrt. Das Cuprizonefutter für Gruppe 3 und 4 wurde von der Firma Ssniff, Deutschland in passender Dosierung (e. d. und h. d.) in Pellets gepresst. Jeder Käfig wurde mit folgenden Bestandteilen ausgestattet: Einstreu, Nestlet, Gehegehaus, 100g des jeweiligen Futters, verteilt auf zwei Petrischalen und jeweils einer

Trinkflasche. Die Trink- und Futterstelle wurde so positioniert, dass die Versuchstiere jederzeit uneingeschränkten Zugang zur Futterstelle hatten. Nach insgesamt dreiwöchiger Fütterung (Abbildung 3) wurde den Versuchstieren eine Narkoselösung verabreicht. Im Anschluss erfolgte die transkardiale Perfusion durch den linken Ventrikel mittels 20ml PBS und 100ml Fixierlösung. Nach Entfernung der Haut konnte die Schädelkalotte durch einen sagittalen Schnitt geöffnet und die Gehirne entnommen werden. Diese wurden im selben Fixativum über Nacht bei 4°C postfixiert. Nach anschließender Wässerung mit Leitungswasser für ca. zwölf Stunden und Lagerung in 50 % Ethanol über Nacht, wurden diese manuell in Paraffinblöcke eingebettet (Tabelle 3). Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica, SM 2000R) wurden 5µm dicke Schnitte in den Ebenen 265 und 295 nach Sidman et al. angefertigt (Abbildung 4). Es wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Anschließend konnten histochemische und immunhistochemische Färbungen angefertigt werden.

70% Ethanol	40 min
70% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
96% Ethanol	40 min
100% Ethanol	40 min
100% Ethanol	60 min
100% Ethanol	60 min
Xylol	40 min
Xylol	40 min
Xylol	40 min
Paraffin	60 min
Paraffin	60 min
Paraffin	2 Tage

Tabelle 3: Manuelle Paraffineinbettung

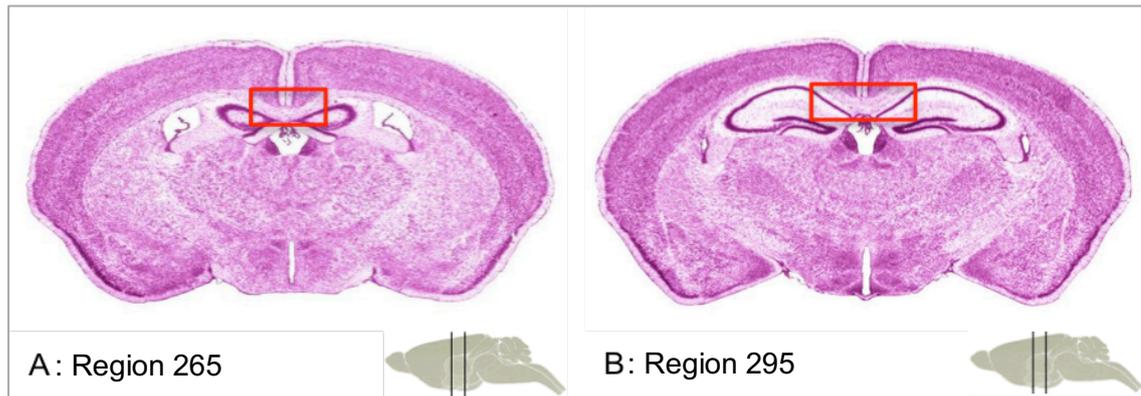


Abbildung 4: Region 265 und Region 295 in einer frontalen Schnitführung (Sidman et al.) in einer HE-Färbung

rot eingerahmte Bereiche markieren das mediale Corpus callosum

2.7 Färbungen

Um die histopathologischen Veränderungen nach Cuprizoneintoxikation zu analysieren, wurden histochemische und immunhistochemische Färbungen angefertigt.

2.7.1 Histochemische Färbungen

Es wurde sowohl eine Luxol Fast Blue/ Periodic Acid Schiffs (LFB/PAS)-Färbung als auch eine Hämatoxylin/ Eosin (HE)-Färbung angefertigt. Während die HE-Färbung genutzt wurde, um die Schnittebenen nach Sidman et al. genau beurteilen zu können, wurde die LFB- Färbung verwendet, um den Myelinisierungsgrad zu analysieren.

2.7.1.1 Durchführung der Luxol Fast Blue/ Periodic Acid Schiffs (LFB/PAS)-Färbung

Während LFB als spezifische histochemische Myelinfärbung Lipoproteine der Myelinscheide blau anfärbt, färbt die PAS-Färbung kohlenhydratreiche Komponenten durch Oxidation von Hydroxylgruppen rot-violett (Goto 1987).

Die Schnitte wurden durch dreimal zehnmütiges Inkubieren in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (2x Ethanol 100% und 2x Ethanol 96% für jeweils drei Minuten) rehydriert. Anschließend wurden die Objektträger in einer Standkuvette über Nacht bei 56°C mit der LFB-Farbstofflösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die überschüssige Farbe zunächst durch 96% Ethanol und destilliertes Wasser herausgespült. Danach begann die Differenzierung mit Lithiumcarbonatlösung (0,05%). Hierfür wurden 0,5g Lithiumcarbonat in 1000ml destilliertem Wasser gelöst. Zunächst wurde mit einer weiteren Verdünnung (1:5) der zuvor hergestellten Lithiumcarbonatlösung gearbeitet. Anschließend wurden die Objektträger für etwa eine Minute in Ethanol 70% gebracht, um die durch die Lithiumcarbonatlösung aufgespaltene Farbstoffbindungen auszuwaschen. Stellte sich die graue Substanz in einer mikro-

skopischen Kontrolle farblos und die weiße Substanz blau-türkis dar, war die LFB-Färbung abgeschlossen. Ansonsten wurde mit Lithiumcarbonat und Ethanol 70% weiter differenziert. Hierzu wurde eine stärkere Verdünnung (1:10) der Lithiumcarbonatlösung verwendet. Danach wurde die PAS-Färbung angeschlossen. Der erste Arbeitsschritt war hierbei die Oxidation mit Perjodsäure 0,5% für zwei Minuten. Danach folgte kurzes Spülen in destilliertem Wasser und die Inkubation der Schnitte in Schiffsreagenz für zehn Minuten. Bei diesem Vorgang färbten sich die Schnitte leicht pink.

Es ist wichtig das Schiffsreagenz vorher auf seine Frische zu überprüfen. Hierfür wurden 10ml Formalin 37% in ein kleines Glas gegeben und einige Tropfen der Schiffsreagenz hinzu pipettiert. Ein frisches Reagenz schlägt schnell zu einer rot-pupur Farbe um.

Unter fließendem Leitungswasser für fünf Minuten schlug die Farbe von leicht pink in dunkel-violett um. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser wurde mit Mayers Hämalan für eine Minute gegengefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Es folgte die aufsteigende Alkoholreihe abschließend im Xylol (Tabelle 4) und das Eindecken mit DPX.

Destilliertes Wasser	3 min
Ethanol 50%	3 min
Ethanol 70%	3 min
Ethanol 96%	3 min
Ethanol 96%	3 min
Ethanol 100 %	3 min
Ethanol 100 %	3 min
Xylol/ Ethanol 50%/50%	5 min
Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
Xylol III	10 min

Tabelle 4: Aufsteigende Alkoholreihe und Vorbereitung mit Xylol zum Eindecken

Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
Xylol III	10 min
Xylol/ Ethanol 50 %/ 50 %	5 min
Ethanol 100 %	3 min
Ethanol 100 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 70 %	3 min
Ethanol 50%	3 min
Destilliertes Wasser	3 min

Tabelle 5: Entparaffinierung mit Xylol und absteigende Alkoholreihe

2.7.1.2 Durchführung einer HE (Hämatoxylin/ Eosin)-Färbung

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und rehydriert (Tabelle 5). Anschließend wurden die Schnitte für sieben Minuten in „Mayers Hämalaun“ inkubiert. Es folgte kurzes Spülen in destilliertem Wasser und zehnminütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Nach erneutem, kurzen Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für fünf Minuten in eine Küvette mit Eosin gestellt. Nach einem weiteren kurzen Spülvorgang in destilliertem Wasser konnte die Kontrolle unter dem Mikroskop erfolgen. Das gewünschte Ergebnis sollte blau gefärbte Zellkerne und rot gefärbte Kollagenfasern, Zytoplasmen und Erythrozyten zeigen. War das Ergebnis zufriedenstellend, konnte mit der aufsteigenden Alkoholreihe ab 70 % Ethanol mit Abschluss im Xylol begonnen werden (Tabelle 4). Die Schnitte wurden mit DPX eingedeckt.

2.7.2 Immunhistochemische Färbungen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten immunhistochemischen Färbungen wurden nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) durchgeführt. Hierbei wird die Spezifität von Antikörpern genutzt, um die Verteilung von Antigenen im histologischen Schnitt sichtbar zu machen.

Der primäre Antikörper bindet an das Zielantigen im Paraffinschnitt. Der nachfolgend hinzugegebene passende biotinylierte sekundärer Antikörper bindet an den primären Antikörper. Durch die hohe Affinität von Avidin zu Biotin bindet der Avidin-Biotin-Komplex an den biotinylierten sekundären Antikörper. Dieser Komplex ist durch eine Peroxidase markiert, welche nach Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidine (3,3'-DAB), durch Umwandlung eines phenolischen Substrats die Farbreaktion auslöst (Abbildung 5).

Für alle immunhistochemischen Färbungen wurde eine Negativ-Kontrolle angefertigt, um unspezifische Farbreaktionen ausschließen zu können. Bei monoklonalen Antikörpern wurden Negativkontrollen mittels passender Isotyp-Antikörper (Tabelle 8) und bei polyklonalen Antikörpern durch Weglassen des ersten Antikörpers angefertigt.

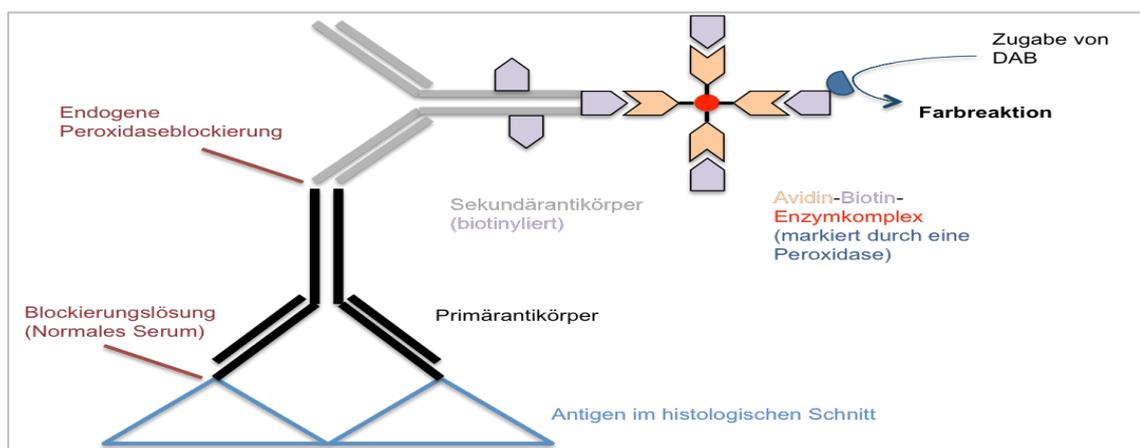


Abbildung 5: Schematische Darstellung der ABC-Methode

2.7.2.1 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tabelle 5). Nach erfolgter Rehydrierung wurden die Schnitte in Tris-EDTA (pH 9,0) auf höchster Stufe einer handelsüblichen Mikrowelle zum Kochen gebracht. Um den Siedepunkt zu erreichen, wurden etwa zwei bis drei Minuten benötigt. Danach wurden die Schnitte zehn Minuten bei geringerer Hitzestufe weiter gekocht. Dieser Vorgang wird „HIER“ (heat induced epitope retrieval) oder Demaskierung genannt und ist notwendig, da aldehydbasierte Einbettungen Protein-Querverbindungen verursachen. Diese können dazu führen, dass einige Epitope der Proteine von passenden Antikörpern nicht mehr gebunden werden. Um reproduzierbare Bedingungen und eine adäquate Hitzeentwicklung beim „HIER“ zu schaffen, wurden alle freien Objektträgerplätze der Färbeschaukel durch Platzhalter aufgefüllt. Anschließend wurden die Objektträger in einem Wasserbad unter fließendem, kaltem Leitungswasser auf Raumtemperatur abgekühlt, um mit dem Waschen in PBS fortfah-

ren zu können. Das Waschen erfolgte immer nach nachfolgend beschriebenem Prinzip: fünf Minuten mit frischer PBS-Lösung unter leichten Bewegungen („Agitation“). Nach drei Waschschritten in PBS folgte die Inkubation mit Blockserum bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer für eine Stunde. Für die anti-APP-A4-Färbung wurde das Blockserum aus 2ml normalem Ziegenserum, 1g bovine serum albumin, 0,1g Fischgelatine, 500µl Tween 20 und 98ml PBS hergestellt. Für alle anderen immunhistochemischen Färbungen bestand das Blockserum aus 2,5ml normalem Ziegenserum und 47,5ml PBS. Die Blocksera verhindern unspezifische Antikörperbindungen und die Inkubation in einer Feuchtekammer die Austrocknung der Schnitte. Anschließend wurden nach Abtropfen des Blockserums (nicht abwaschen) jeweils 50µl des jeweiligen primären Antikörpers oder des passenden Isotypen auf die Schnitte pipettiert (Tabelle 6). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Die Objektträger wurden in einer abgedunkelten Standkuvette mit einer 0,3% H₂O₂-Lösung für dreißig Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte für eine Stunde mit dem passenden biotinylierten sekundären Antikörper (Tabelle 7) in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Spülen in PBS wurde der Avidin-Biotin-Komplex auf die Schnitte gegeben und ebenfalls in einer Feuchtekammer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) für zehn Minuten wurde die bräunliche Farbreaktion erreicht. Um die Farbreaktion zu beenden, wurden die Schnitte zunächst mit Leitungswasser (einige Sekunden) und anschließend mit destilliertem Wasser (ca. drei Minuten) abgespült. Durch die aufsteigende Alkoholreihe (Tabelle 4) wurden die Schnitte dehydriert. Die Inkubation in Xylol für insgesamt dreißig Minuten brachte die Schnitte wieder in ein lipophiles Milieu, um das Eindecken mit DPX zu ermöglichen.

Antikörper	Verdünnung/ Konzentration	Firma	Bestellnummer	Demaskierung
Kaninchen-anti-IBA1 IgG	1:5000 / 0,5-0,7mg/ml	Wako	019-19741	Tris-EDTA
Maus-anti-PLP IgG	1:5000 / 1,0mg/ml	Serotec	MCA-839G	keine
Maus-anti-APP-A4 IgG	1:5000 / 1mg/ ml	Merck-Millipore	MAB-348	Tris-EDTA
Kaninchen-anti-ALDH1L1 IgG	1:2000 / 0.7-1 mg/ml	Abcam	Ab87117	keine

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung/ Konzentration	Wirt	Firma	Bestellnummer
Anti-Kaninchen IgG (biotinyliert)	1:200 / 1,5mg/ml	Ziege	VECTOR	BA 1000
Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	1:200 / 1,5mg/ml	Ziege	VECTOR	BA 9200

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper

Isotypen	Verdünnung/ Konzentration	Firma	Bestellnummer
Isotyp IgG 1 (APP-A4)	1:2500 / 0,5mg/ml	Abcam	AB 18443
Isotyp IgG 2a (PLP)	1:2500 / 0,5mg/ml	Abcam	AB 18415

Tabelle 8: Verwendete Isotyp-Antikörper

2.8 Auswertung

2.8.1 Beurteilung der LFB-Färbeintensität / anti-PLP-Immunreaktivität

Um die verschiedenen Demyelinisierungsgrade nach Cuprizoneintoxikation zu beurteilen, wurde zum einen Luxol Fast Blue/ Periodic Acid Schiffs (LFB/PAS)-Färbungen und zum anderen anti-Proteolipid Protein (anti-PLP)-Färbungen angefertigt. Ausgewertet wurde, wie in Abbildung 4 gezeigt, das mediale CC in zwei verschiedenen Schnittebenen (265 und 295 nach Sidman *et. al.*). Um eine reproduzierbare Quantifizierung der Myelindichte zu ermöglichen, wurde zunächst ein Bewertungssystem entwickelt, welches verschiedene Grade der LFB-Färbeintensität/ anti-PLP-Immunreaktivität definiert. Der Wert 4 entsprach einer starken LFB-Färbeintensität/ hohe anti-PLP-Immunreaktivität im CC. Das dichte und lückenlose Fasernetz war bei der LFB-Färbung intensiv blau und bei der anti-PLP-Färbung intensiv braun angefärbt. Der Wert 3 entsprach einem leicht aufgelockerten Fasernetz. Die blaue/braune Farbe war im histologischen Schnitt deutlich erkennbar, jedoch weniger intensiv. Der Wert 2 entsprach einem lückenhaften blau/braun angefärbtem Fasernetz. Zunehmend wurden weißliche Bereiche zwischen den verbliebenen Fasern sichtbar. Der Wert 1 entsprach einer nahezu bis vollständig aufgehobenen LFB-Farbreaktion/ anti-PLP-Immunreaktivität.

Die Bewertungssysteme sind beispielhaft für die Region 295 (Sidman *et. al.*) in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

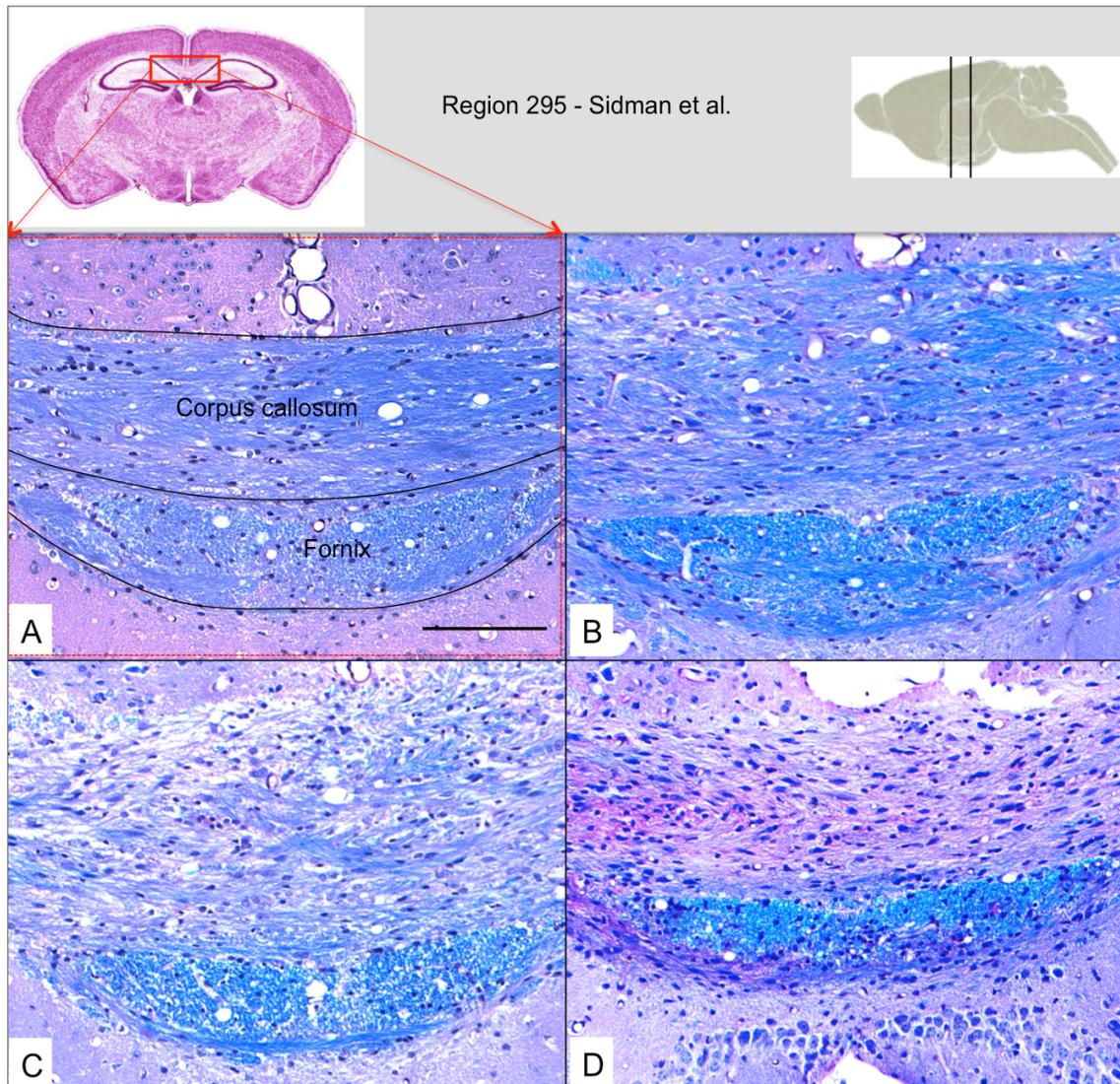


Abbildung 6: Demonstration verschiedener starker LFB-Färbeintensität im *Corpus callosum* (CC)

A: Histologischer Schnitt mit hoher LFB-Färbeintensität; entspricht dem Wert 4 **B:** histologischer Schnitt mit leicht reduzierter LFB-Färbeintensität; entspricht dem Wert 3 **C:** histologischer Schnitt mit deutlich reduzierter LFB-Färbeintensität; entspricht dem Wert 2 **D:** histologischer Schnitt mit nahezu vollständig aufgehobener LFB-Färbeintensität; entspricht dem Wert 1 (Maßstab = 100 µm)

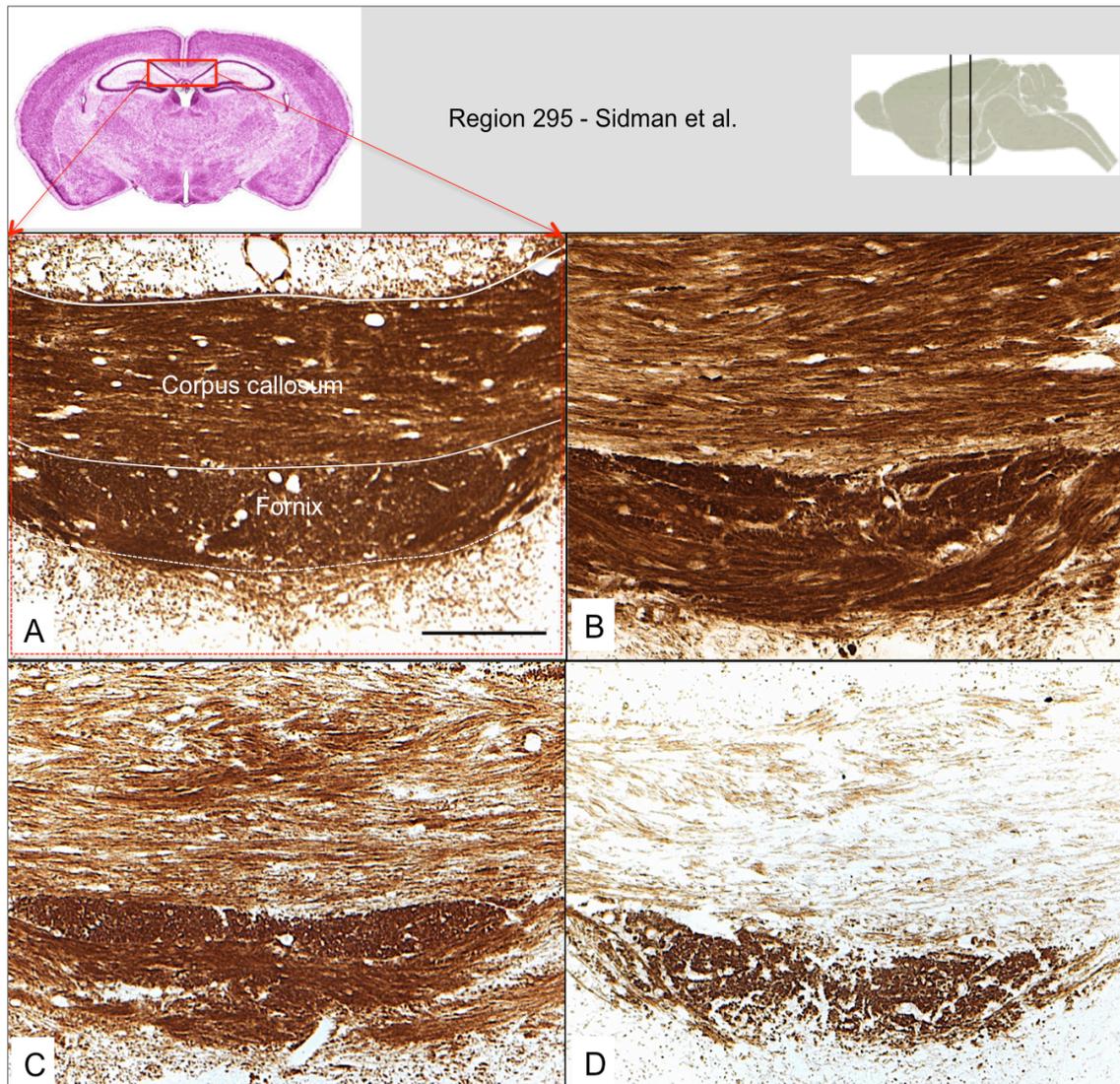


Abbildung 7: Demonstration verschieden starker anti-PLP-Immunreaktivität im *Corpus callosum* (CC)

A: histologischer Schnitt mit hoher anti-PLP-Immunreaktivität, entspricht dem Wert 4 **B:** histologischer Schnitt mit leicht reduzierter anti-PLP-Immunreaktivität, entspricht dem Wert 3 **C:** histologischer Schnitt mit deutlich reduzierter anti-PLP-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 2 **D:** histologischer Schnitt mit nahezu vollständig aufgehobener anti-PLP-Immunreaktivität, entspricht dem Wert 1 (Maßstab = 100 µm)

2.8.2 Beurteilung der anti-IBA1- und anti-ALDH1L1-Immunreaktivität

Die anti-ionized calcium binding adapter molecule 1 (anti-IBA1)-Färbung ist eine immunhistochemische Färbung, die Mikroglia und Monozyten/Makrophagen anfärbt. Deshalb wurde sie genutzt, um eine Mikrogliose im CC nachzuweisen. Um eine reproduzierbare Quantifizierung der Mikrogliaaktivierung zu ermöglichen, wurde zunächst ein Bewertungssystem entwickelt, welches verschiedene Grade der anti-IBA1-Immunreaktivität definiert. Der Wert 1 entsprach einer physiologisch geringen anti-IBA1-Immunreaktivität. Keine oder sehr wenige braun angefärbte, IBA1-positive Zellen konnten im CC Schnitt nachgewiesen werden. Der Wert 2 entsprach einer leicht erhöhten anti-IBA1-Immunreaktivität und der Wert 3 einer deutlich erhöhten anti-IBA1-Immunreaktivität. Zunehmend höhere Anzahlen braun angefärbter, IBA1-positiver Zellen konnten im CC nachgewiesen werden. Der Wert 4 entsprach einer sehr hohen anti-IBA1-Immunreaktivität. Im CC konnten sehr viele IBA1-positive Zellen nachgewiesen werden.

Die immunhistochemische anti-Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member L1 (anti-ALDH1L1)-Färbung wurde angefertigt, um eine Astrozytose im CC nachzuweisen. Um eine reproduzierbare Quantifizierung der Astrozytenaktivierung zu ermöglichen, wurde ebenfalls ein Bewertungssystem entwickelt, welches verschiedene Grade der anti-ALDH1L1-Immunreaktivität definiert.

Der Wert 1 entsprach einer physiologisch geringen anti-ALDH1L1-Immunreaktivität. Keine oder sehr wenige ALDH1L1-positive Zellen konnten im CC nachgewiesen werden. Der Wert 2 entsprach einer leicht erhöhten anti-ALDH1L1-Immunreaktivität und der Wert 3 einer deutlich erhöhten anti-ALDH1L1-Immunreaktivität. Zunehmend höhere Anzahlen braun angefärbter, ALDH1L1-positiver Zellen konnten im CC nachgewiesen werden. Der Wert 4 entsprach einer sehr hohen anti-ALDH1L1-Immunreaktivität. Im CC konnten sehr viele ALDH1L1-positive Zellen nachgewiesen werden.

Die Bewertungssysteme der beiden Färbungen sind ebenso beispielhaft an Region 295 (Sidman et. al.) in Abbildung 8 und 9 dargestellt.

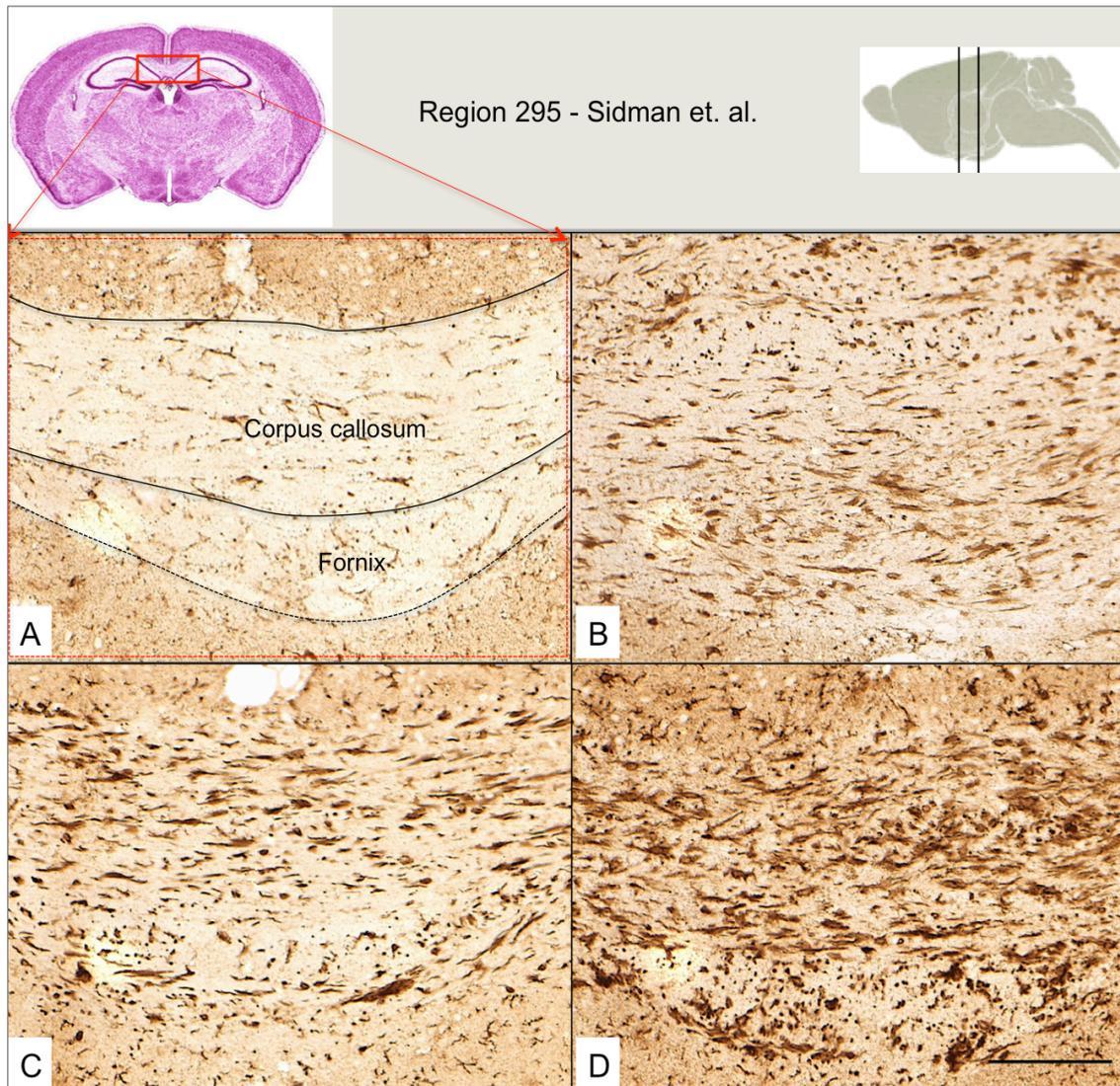


Abbildung 8: Demonstration verschieden starker anti-IBA1-Immunreaktivität im *Corpus callosum* (CC)

A: histologischer Schnitt mit physiologisch sehr niedriger anti-IBA1-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 1 **B:** histologischer Schnitt mit niedriger anti-IBA1-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 2 **C:** histologischer Schnitt mit hoher anti-IBA1-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 3 **D:** histologischer Schnitt mit sehr hoher anti-IBA1-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 4 (Maßstab = 100 µm)

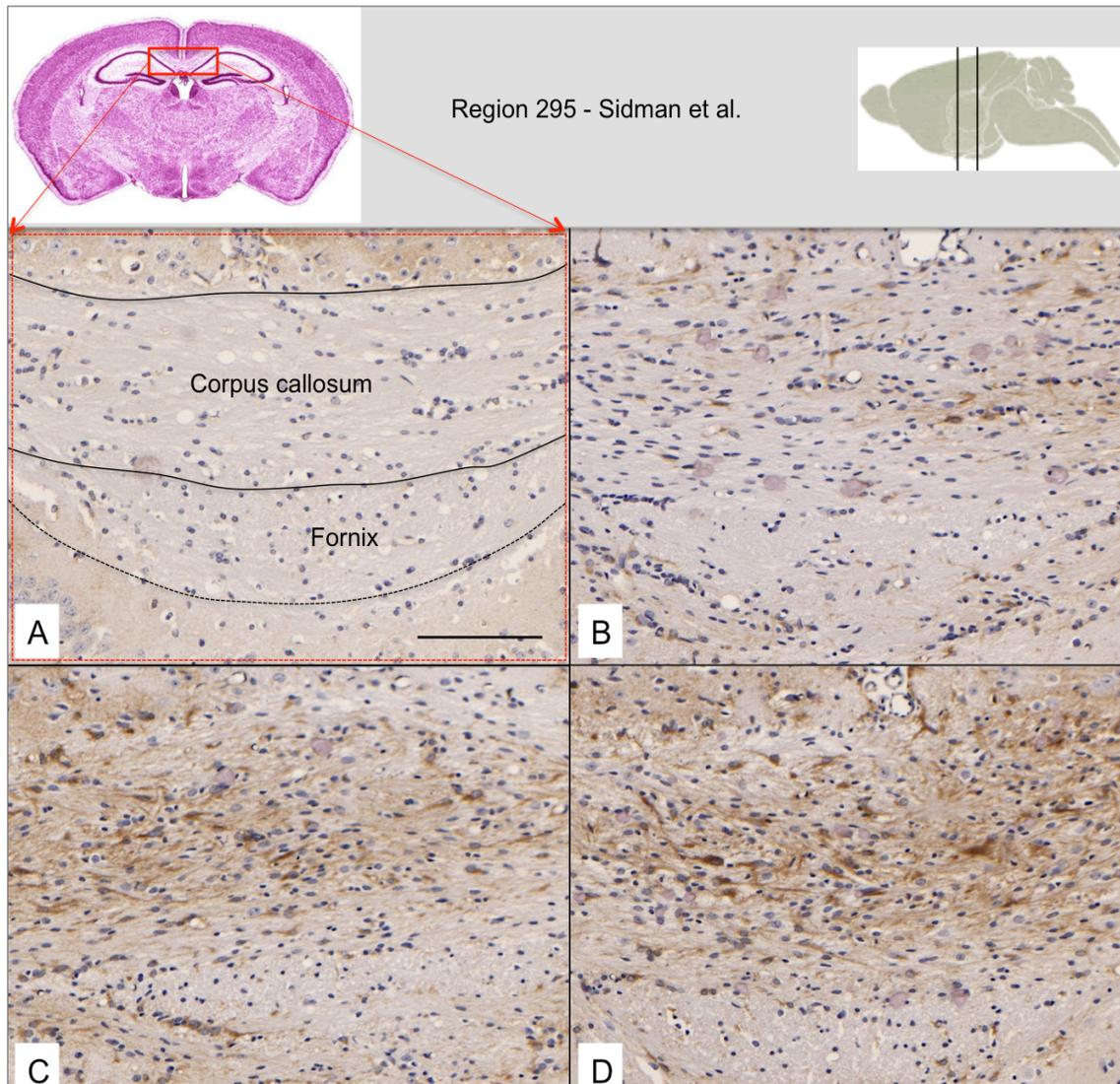


Abbildung 9: Demonstration verschieden starker anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im *Corpus callosum* (CC)

A: histologischer Schnitt mit physiologisch sehr niedriger anti-ALDH1L1-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 1 **B:** histologischer Schnitt mit niedriger anti-ALDH1L1-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 2 **C:** histologischer Schnitt mit hoher anti-ALDH1L1-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 3 **D:** histologischer Schnitt mit sehr hoher anti-ALDH1L1-Immunreaktivität; entspricht dem Wert 4 (Maßstab = 100 µm)

2.8.3 Beurteilung der akuten axonalen Schädigung

Die hierfür angefertigte immunhistochemische anti-Amyloid beta precursor A4 fusion protein (anti-APP_{A4})-Färbung zeigt bei akut geschädigten Axonen eine Akkumulation von APP. Vesikel beladen mit Membranmaterial und/oder Substanzen, die zur Sekretion bestimmt sind wie zum Beispiel Neurotransmitter werden mittels der Motorproteine Kinesin und Dynein entlang der Mikrotubuli transportiert. In Neuronen wird beispielsweise das sogenannte Alzheimer Precursor Protein (APP) in tubulären Vesikeln *via* anterogradem Transport zur Synapse transportiert (Kaether, Skehel et al. 2000). Bei einem geschädigten Axon wird der Transport an der defekten Stelle unterbrochen und APP_{A4} akkumuliert. Diese Akkumulation kann mittels der durchgeführten immunhistochemischen Färbung gegen APP_{A4} sichtbar gemacht werden. Im histologischen Schnitt wurden sogenannte „Sphäroide“ nachweisbar (Abbildung 10) (Sherriff, Bridges et al. 1994, Stone, Singleton et al. 2000).

Die Fläche des CCs aller Schnitte wurde mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ 2.0.0 für Mac OS X berechnet. Nachfolgend wurden die „Sphäroide“, die sich in der zuvor gemessenen Fläche befinden, ausgezählt. Angegeben wurde die Sphäroid-Anzahl pro mm². Abbildung 10 zeigt beispielhaft an Region 295 eine durch Cuprizone erhöhte Sphäroidendichte.

Alle Bilder für die Auswertung wurden mit einem „Zeiss Axiophot“ Mikroskop aufgenommen (Zeiss, Deutschland), welches mit einer digitalen „Zeiss Axio Cam HRC“ Kamera ausgestattet ist.

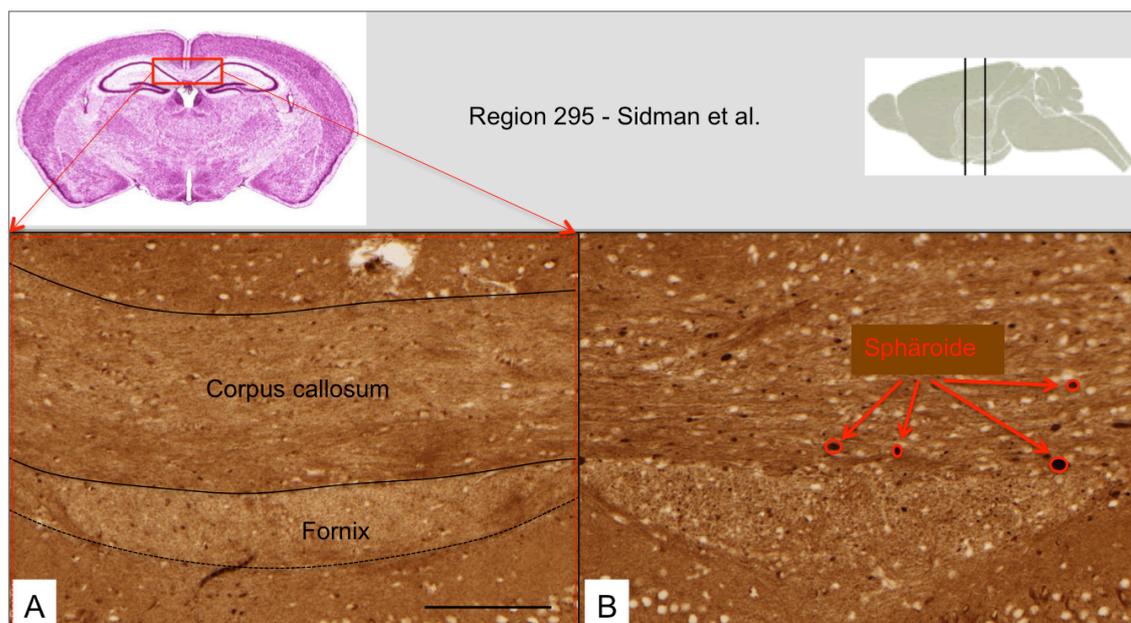


Abbildung 10: Nachweis von Sphäroiden mittels einer anti-APP_{A4}-immunhistochemischer Färbung
A: histologisches Bild eines Kontrolltieres. **B:** Sphäroide nach Cuprizoneintoxikation. (Maßstab = 100 µm)

2.8.4 Statistische Auswertung

Nachdem die Präparate nach oben genannten Bewertungssystemen von zwei Personen verblindet beurteilt waren, konnten die Daten statistisch ausgewertet werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.04 für Windows). Die Daten wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Im Anschluss erfolgte bei Normalverteilung der Nachweis statistisch signifikanter Unterschiede durch eine einfaktorielle ANOVA-Analyse („one - way analysis of variance“) und einem Bonferroni post-hoc Test. Waren die Werte nicht normal verteilt, wurden die Daten mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests und einem Dunn's post hoc Test analysiert. Alle Daten wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler („Standard Error of the Mean“ (SEM)) angegeben. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Effekte, die sich in Bezug auf die Gruppe mit Cuprizonepulverintoxikation ergaben, wurden durch Sternchen hervorgehoben (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

3 Ergebnisse

3.1 Geringerer Verlust von PLP und LFB-bindenden Proteinen im *Corpus callosum* nach Fütterung von Cuprizonepellets

Das CC stellt eine geeignete Gehirnregion für Cuprizone-induzierte Pathologien dar (Goldberg, Clarner et al. 2015). Zu diesen gehören vorrangig Demyelinisierung, Astrozyten- und Mikrogliaaktivierung und axonaler Schaden. (Kipp, Clarner et al. 2009)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die verschiedenen Applikationsformen (Pulver bzw. Pellet) das Ausmaß der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung beeinflussen.

In den Abbildungen 11, 12, 13 und 14 sind die hierfür angefertigten LFB/PAS-histochemischen als auch anti-PLP-immunhistochemischen Färbungen der Regionen 265 und 295 nach Sidman et al. gezeigt. Zur Bewertung der Demyelinisierung wurden verblindet Werte zwischen 1 (ausgeprägte Demyelinisierung) und 4 (keine Demyelinisierung) vergeben. Hohe Werte entsprachen einer hohen LFB-Färbeintensität/ anti-PLP-Immunreaktivität und niedrige Werte einer niedrigen LFB-Färbeintensität/ anti-PLP-Immunreaktivität.

Unter Kontrollbedingungen ergaben sich bei beiden Färbungen erwartungsgemäß hohe Werte. In Region 265 ergab sich der Wert $3,9 \pm 0,1$ (LFB/PAS-Färbung) und der Wert $3,7 \pm 0,2$ (anti-PLP-Färbung); in Region 295 der Wert $4,0 \pm 0$ (LFB/PAS-Färbung) und der Wert $3,7 \pm 0$ (anti-PLP-Färbung).

Bei der Auswertung der LFB-Färbeintensität nach Cuprizoneintoxikation ergab sich in Region 265 bei den mit Pulver-behandelten Tieren der Wert $1,0 \pm 0$; bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren der Wert $2,2 \pm 0,25$ und bei den mit Pellets h.d.-behandelten Tieren der Wert $1,38 \pm 0,24$ (Abbildung 11). In Region 295 ergab sich nach Cuprizoneintoxikation bei den mit Pulver-behandelten Tieren der Wert $1,0 \pm 0$, bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren der Wert $2,5 \pm 0,16$ und bei den mit Pellets h.d.-behandelten Tieren der Wert $1,8 \pm 0,25$ (Abbildung 12). In Region 295 war die höhere LFB-Färbeintensität zwischen den mit Pulver-behandelten Tieren und den mit Pellets e.d.- behandelten Tieren statistisch signifikant ($p \leq 0.05$).

Bei der Auswertung der anti-PLP-Immunreaktivität nach Cuprizoneintoxikation ergab sich in Region 265 bei den mit Pulver-behandelten Tieren der Wert $1,0 \pm 0$, bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren der Wert $2,4 \pm 0,24$ und bei den mit Pellets h.d.-behandelten Tieren der Wert $2,0 \pm 0$ (Abbildung 13). In Region 295 ergab sich nach Cuprizoneintoxikation bei den mit Pulver-behandelten Tieren der Wert $1,0 \pm 0$, bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren der Wert $3,0 \pm 0$ und bei den mit Pellets h.d.-

behandelten Tieren der Wert $1,8 \pm 0,2$ (Abbildung 14). Die höhere anti-PLP-Immunreaktivität zwischen den mit Pulver-behandelten Tieren und den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren war in beiden Regionen statistisch signifikant ($p \leq 0.05$).

Da LFB an Proteine der Myelinscheiden bindet, legt eine hohe LFB-Farbintensität oder hohe Werte eine physiologische Myelindichte nahe, während niedrige Farbintensität oder niedrige Werte für Demyelinisierung sprechen. PLP ist ein Bestandteil von Myelinscheiden, sodass hier ebenfalls bei niedriger anti-PLP-Immunreaktivität oder niedrigen Werten von Demyelinisierung auszugehen ist.

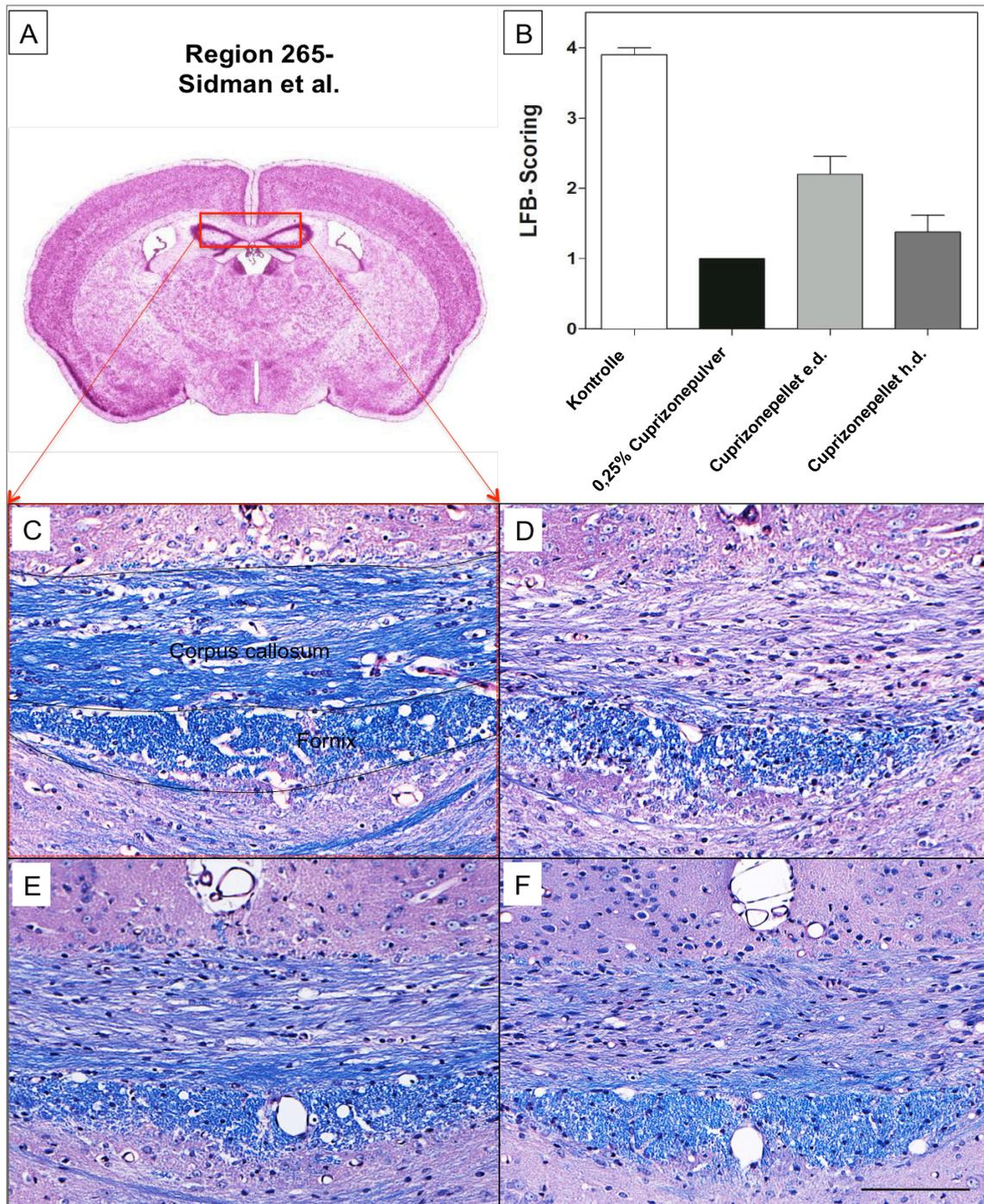


Abbildung 11: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf die LFB-Färbeintensität im *Corpus callosum* (CC) in Region 265

A: Der rot umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen LFB-Färbeintensität nach dem beschriebenen Bewertungssystem. **C:** Sehr hohe LFB-Färbeintensität im CC von Kontrolltieren **D:** Sehr niedrige LFB-Färbeintensität im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** Hohe LFB-Färbeintensität im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Niedrige LFB-Färbeintensität im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

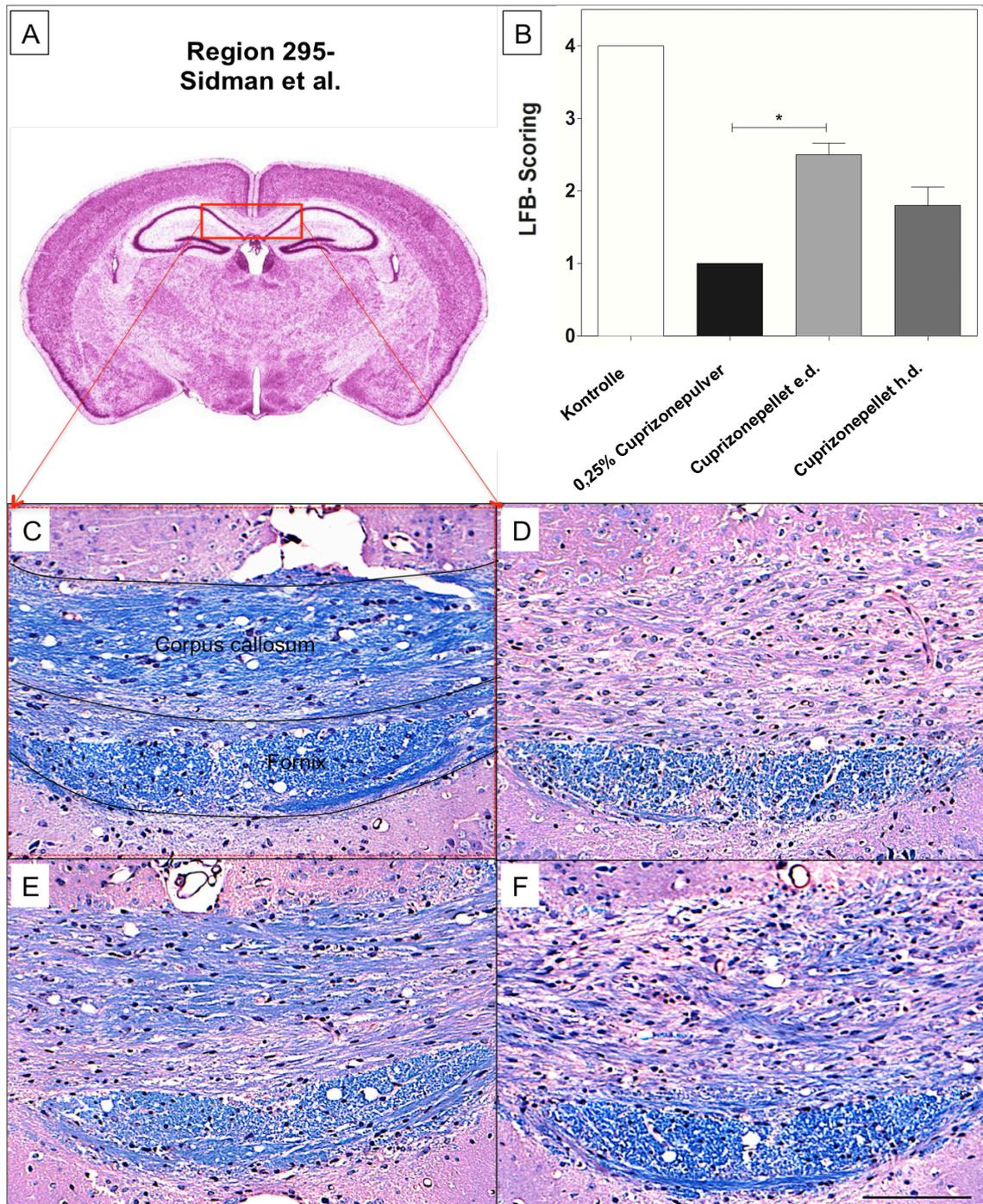


Abbildung 12: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf die LFB-Färbeintensität im *Corpus callosum* (CC) in Region 295

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen LFB-Färbeintensitäten nach dem beschriebenen Bewertungssystem **C:** Sehr hohe LFB-Färbeintensität im CC von Kontrolltieren **D:** Sehr niedrige LFB-Färbeintensität im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** Hohe LFB-Färbeintensität im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Niedrige LFB-Färbeintensität im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

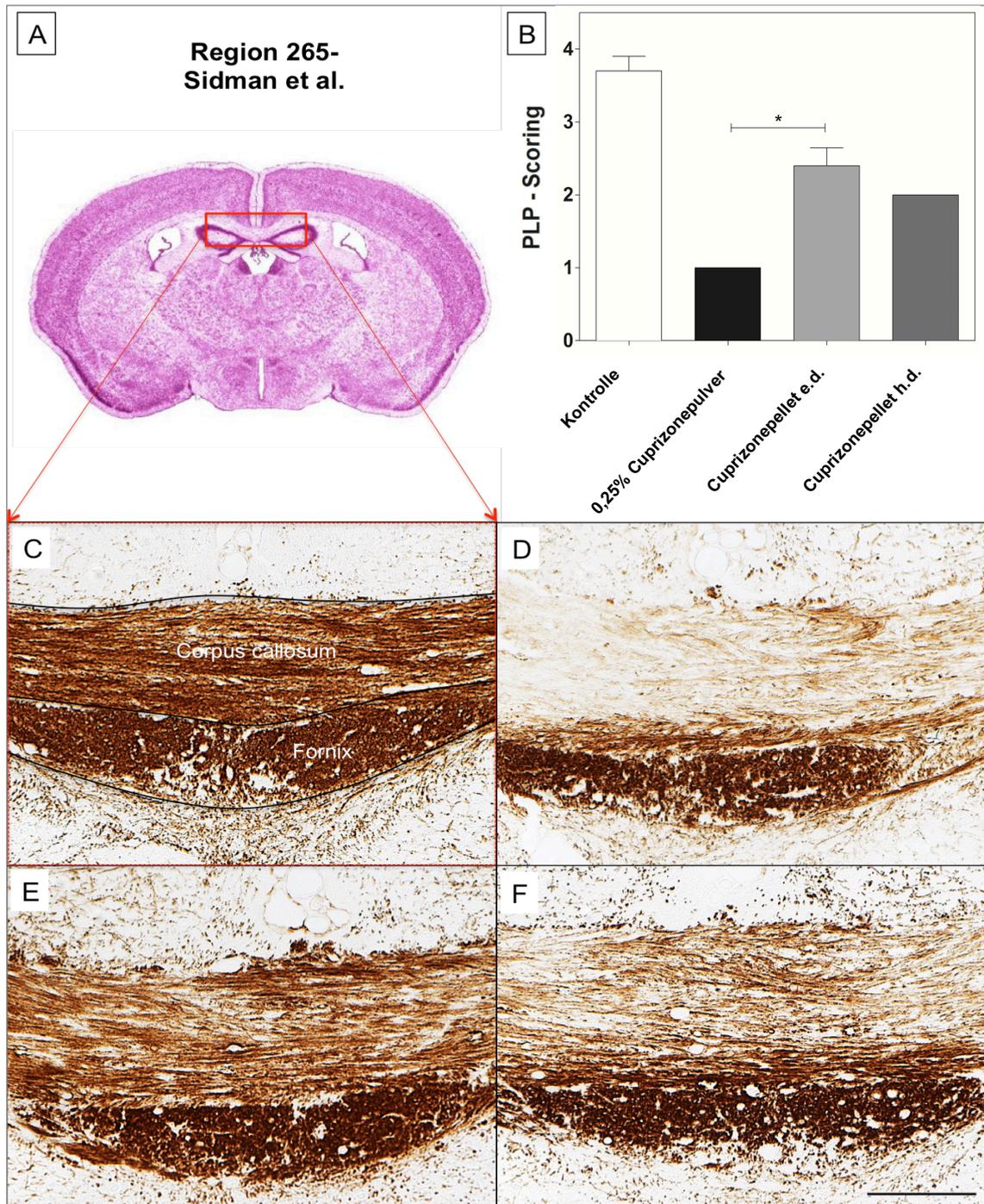


Abbildung 13: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von PLP im *Corpus callosum* (CC) in Region 265

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen anti-PLP-Immunreaktivität nach dem beschriebenen Bewertungssystem. **C:** Hohe anti-PLP-Immunreaktivität im CC von Kontrolltieren. **D:** nahezu aufgehobene anti-PLP-Immunreaktivität im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** Mittelstarke anti-PLP-Immunreaktivität im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Leichte anti-PLP-Immunreaktivität im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

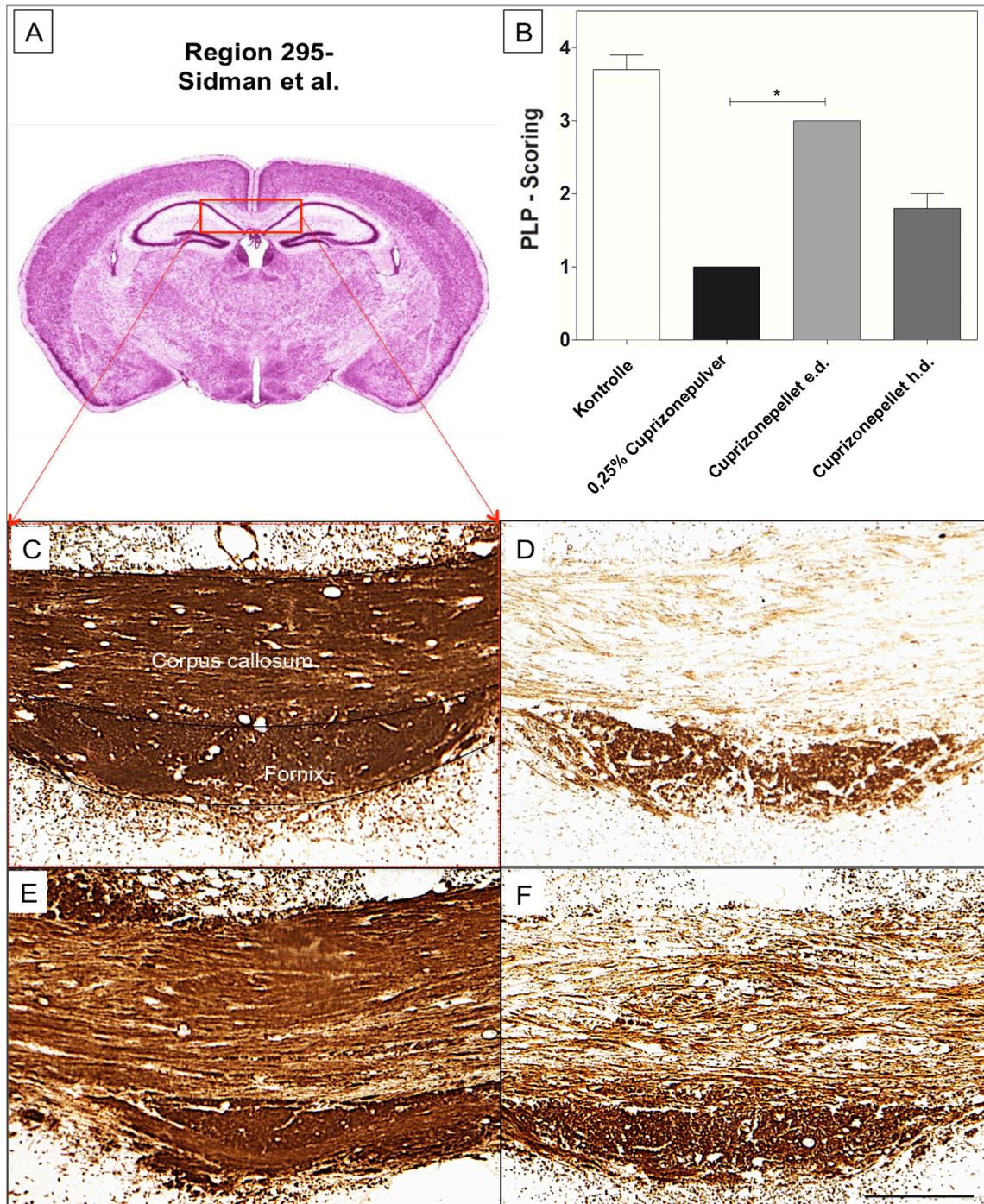


Abbildung 14: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von PLP im *Corpus callosum* (CC) in Region 295

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen anti-PLP-Immunreaktivität nach dem beschriebenen Bewertungssystem **C:** Hohe anti-PLP-Immunreaktivität im CC von Kontrolltieren **D:** nahezu aufgehobene anti-PLP-Immunreaktivität im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** Mittelstarke anti-PLP-Immunreaktivität im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Leichte anti-PLP-Immunreaktivität im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

3.2 Geringere IBA1- Expression im *Corpus callosum* nach Fütterung von Cuprizonepellets

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die verschiedenen Applikationsformen (Pulver bzw. Pellet) das Ausmaß der Cuprizone-induzierten Mikrogliaaktivierung beeinflussen.

In den Abbildungen 15 und 16 sind die hierfür angefertigten anti-IBA1-immunhistochemische Färbungen der Regionen 265 und 295 nach Sidman et al. gezeigt. Zur Bewertung der Mikrogliaaktivierung wurden verblindet Werte zwischen 1 (keine Mikrogliaaktivierung) und 4 (ausgeprägte Mikrogliaaktivierung) vergeben. Hohe Werte entsprachen einer hohen anti-IBA1-Immunreaktivität und niedrige Werte einer niedrigen anti-IBA1-Immunreaktivität.

Unter Kontrollbedingungen ergaben sich mit dem Wert 1 ± 0 in beiden Regionen erwartungsgemäß niedrige Werte.

Bei der Auswertung der anti-IBA1-Immunreaktivität nach Cuprizoneintoxikation ergab sich in Region 265 bei den mit Pulver-behandelten Tieren der Wert $3,6 \pm 0,19$, bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren der Wert $2,4 \pm 0,19$ und bei den mit Pellets h.d.-behandelten Tieren der Wert $3,0 \pm 0$ (Abbildung 15). In Region 295 ergab sich nach Cuprizoneintoxikation bei den mit Pulver-behandelten Tieren der Wert $3,7 \pm 0,12$, bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren der Wert $2,5 \pm 0,39$ und bei den mit Pellets h.d.-behandelten Tieren der Wert $3,2 \pm 0,25$ (Abbildung 16).

IBA1 ist ein Protein, welches im Gehirn vor allem von Mikroglia produziert wird. Daher spricht eine erhöhte anti-IBA1-Immunreaktivität für eine Hyperplasie (Vermehrung) und Hypertrophie (Vergrößerung) dieser Zellen. Die IBA1-positiven Zellen im Gehirn der Kontrolltiere zeigten in Vergrößerung schlanke, runde Zellkörper mit dünnen, verzweigten Fortsätzen. Nach Cuprizoneintoxikation waren die IBA1-positiven Zellen hingegen nicht nur hyperplastisch und hypertroph, sondern zeigten passend zum aktivierten Phänotyp einer Mikrogliazelle geschwollene Zellkörper mit kurzen, weniger verzweigten Fortsätzen.

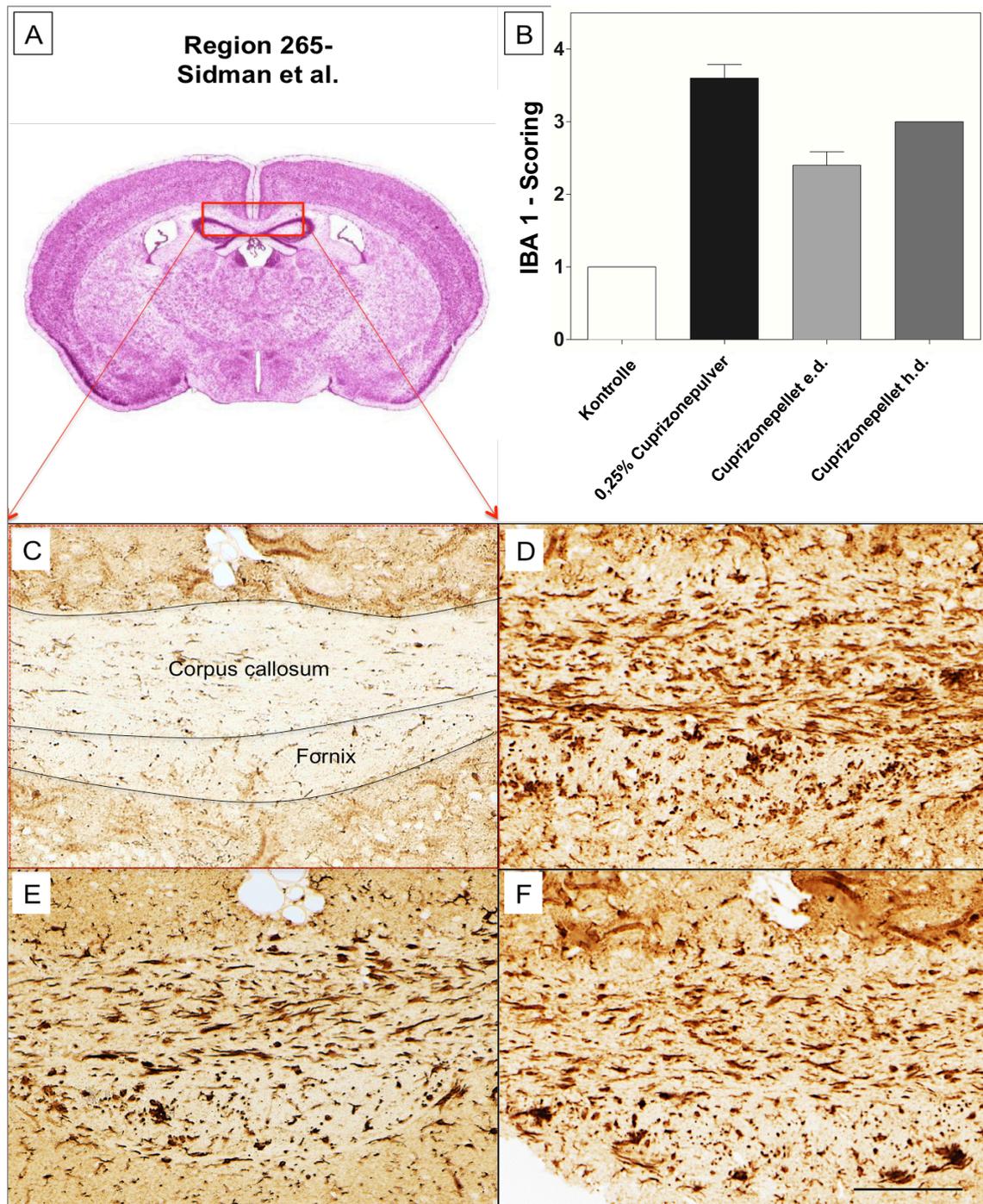


Abbildung 15: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von IBA1 im *Corpus callosum* (CC) in Region 265

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen anti-IBA1-Immunreaktivität nach dem beschriebenen Bewertungssystem **C:** Sehr niedrige anti-IBA1-Immunreaktivität im CC von Kontrolltieren. **D:** Hohe bis sehr hohe anti-IBA1-Immunreaktivität im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** mäßige anti-IBA1-Immunreaktivität im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** hohe anti-IBA1-Immunreaktivität im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

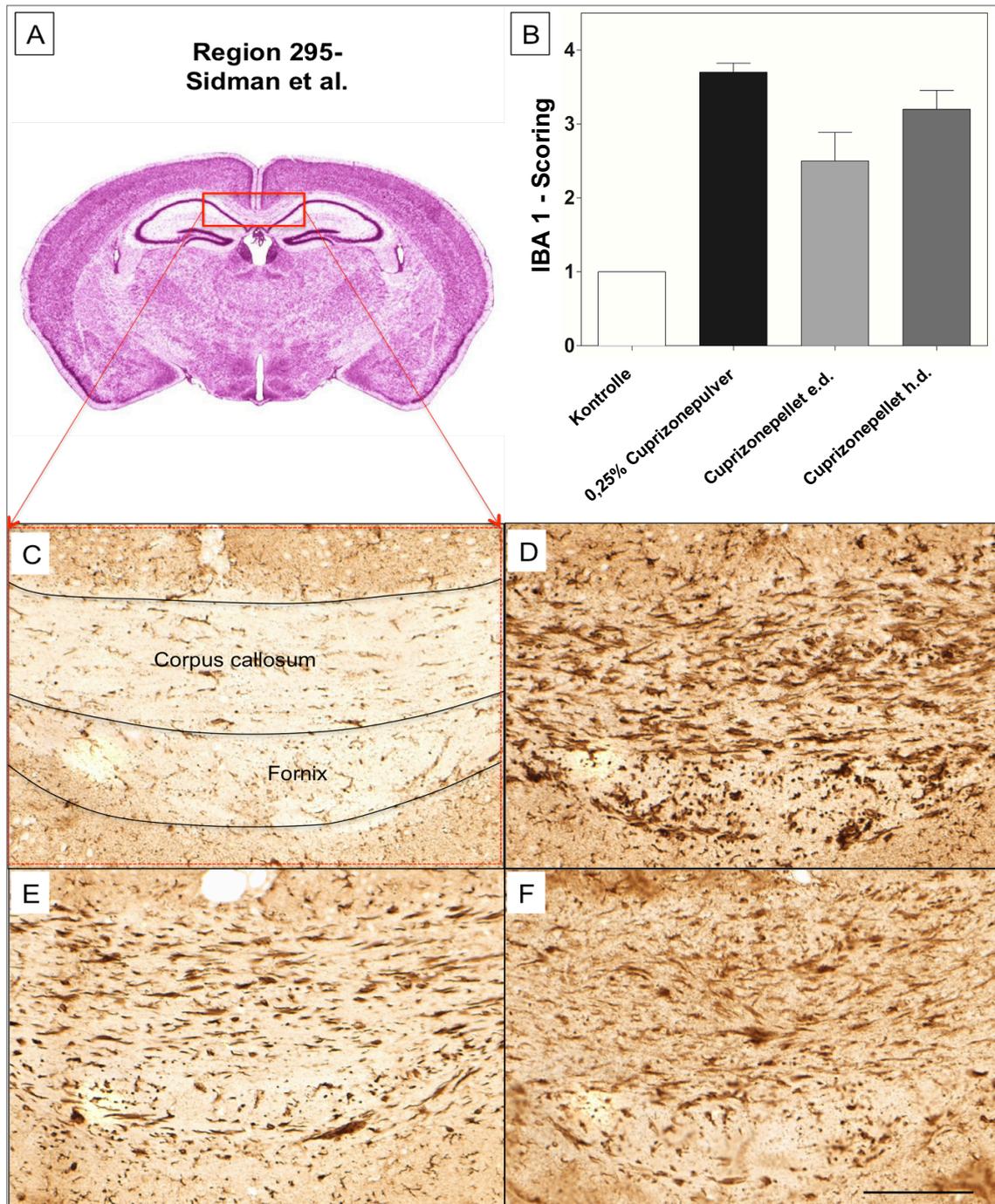


Abbildung 16: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von IBA1 im *Corpus callosum* (CC) in Region 295

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen anti-IBA1-Immunreaktivität nach dem beschriebenen Bewertungssystem **C:** Sehr niedrige anti-IBA1-Immunreaktivität im CC von Kontrolltieren **D:** Hohe bis sehr hohe anti-IBA1-Immunreaktivität im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** Mäßige anti-IBA1-Immunreaktivität im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Hohe IBA1-Immunreaktivität im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

3.3 Vergleichbare ALDH1L1-Expression im *Corpus callosum* nach Fütterung von Cuprizonepellets

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die verschiedenen Applikationsformen (Pulver bzw. Pellet) das Ausmaß der Cuprizone-induzierten Astrozytenaktivierung beeinflussen.

In den Abbildungen 17 und 18 sind die hierfür angefertigten anti-ALDH1L1-immunhistochemischen Färbungen der Regionen 265 und 295 nach Sidman et al. gezeigt. Zur Bewertung der Astrozytenaktivierung wurden verblindet Werte zwischen 1 (keine Astrozytenaktivierung) und 4 (ausgeprägte Astrozytenaktivierung) vergeben. Hohe Werte entsprachen einer hohen anti-ALDH1L1-Immunreaktivität und niedrige Werte einer niedrigen anti-ALDH1L1-Immunreaktivität.

Unter Kontrollbedingungen ergaben sich mit dem Wert $1,2 \pm 0,2$ in Region 265 und dem Wert 1 ± 0 in Region 295 erwartungsgemäß niedrige Werte.

Bei der Auswertung der anti-ALDH1L1-Immunreaktivität nach Cuprizoneintoxikation ergab sich in Region 265 bei den mit Pulver-behandelten Tieren der Wert $2,5 \pm 0,54$; bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren der Wert $2,6 \pm 0,29$ und bei den mit Pellets h.d.-behandelten Tieren der Wert $2,5 \pm 0,32$ (Abbildung 17). In Region 295 ergab sich nach Cuprizoneintoxikation bei den mit Pulver-behandelten Tieren der Wert $2,8 \pm 0,34$, bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren der Wert $2,0 \pm 0,35$ und bei den mit Pellets h.d.-behandelten Tieren der Wert $2,88 \pm 0,55$ (Abbildung 18). ALDH1L1 ist ein Marker für Astrozyten, sodass eine hohe anti-ALDH1L1-Immunreaktivität eine Astrozytenaktivierung widerspiegelt.

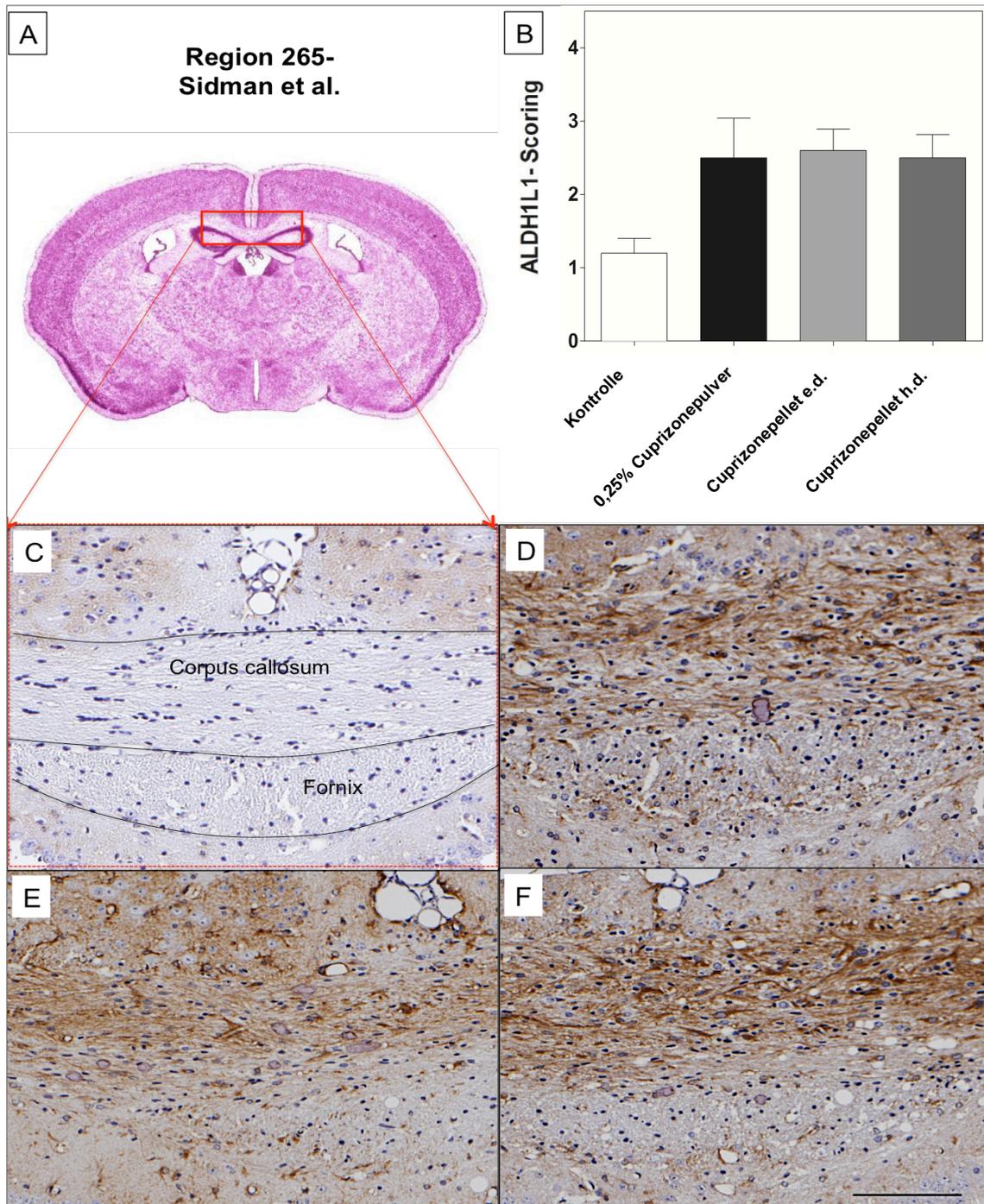


Abbildung 17: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von ALDH1L1 im *Corpus callosum* (CC) in Region 265

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen anti-ALDH1L1-Immunreaktivität nach dem beschriebenen Bewertungssystem **C:** Sehr niedrige anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im CC von Kontrolltieren. **D:** Deutliche anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** Deutliche anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Deutliche anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

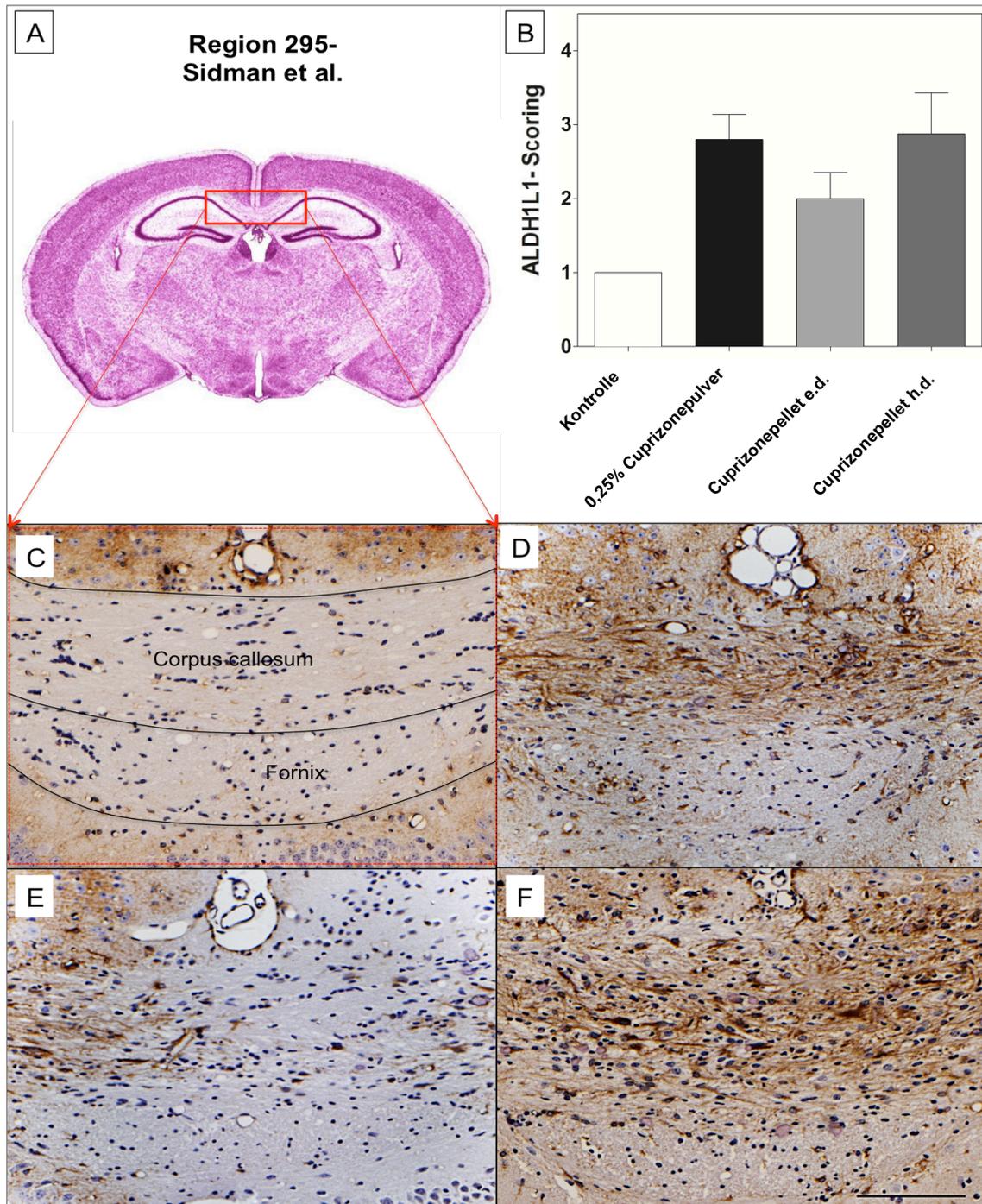


Abbildung 18: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf den immunhistochemischen Nachweis von ALDH1L1 im *Corpus callosum* (CC) in Region 295

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen anti-ALDH1L1-Immunreaktivität nach dem beschriebenen Bewertungssystem **C:** Sehr niedrige anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im CC von Kontrolltieren. **D:** Deutliche anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im CC von Pulverbehandelten Tieren **E:** Mäßige anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Deutliche anti-ALDH1L1-Immunreaktivität im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

3.4 Geringere Sphäroidendichte im *Corpus callosum* nach Fütterung von Cuprizonepellets

Abschließend wurde untersucht, ob die verschiedenen Applikationsformen (Pulver bzw. Pellet) das Ausmaß des Cuprizone-induzierten, akuten axonalen Schadens beeinflussen.

In den Abbildungen 19 und 20 sind die hierfür angefertigten anti-APPA4-immunohistochemischen Färbungen der Regionen 265 und 295 nach Sidman et al. gezeigt. Die APP-positiven Sphäroide wurden durch manuelle Auszählung mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ ausgewertet. Die Sphäroide wiesen eine eiförmige bis regentropfenartige Form auf.

Unter Kontrollbedingungen waren in beiden untersuchten Regionen erwartungsgemäß keine Sphäroide nachweisbar.

In Region 265 konnten nach Cuprizoneintoxikation bei den mit Pulver-behandelten Tieren 498 ± 110 Sphäroiden/mm², bei den mit Pellets (e.d.)-behandelten Tieren 228 ± 99 Sphäroiden/mm² und bei den mit Pellets (h.d.)-behandelten Tieren 436 ± 129 Sphäroiden/mm² nachgewiesen werden (Abbildung 19).

In Region 295 konnten bei den mit Pulver-behandelten Tieren 502 ± 75 Sphäroiden/mm², bei den mit Pellets e.d.-behandelten Tieren 112 ± 54 und bei den mit Pellet h.d.-behandelten Tieren 542 ± 98 Sphäroiden/mm² nachgewiesen werden (Abbildung 20). In Region 295 war die geringere Sphäroidendichte zwischen den mit Pulver-behandelten Tieren und den mit Pellets (e.d.)-behandelten Tieren statistisch signifikant ($p \leq 0.01$).

Da APP an der geschädigten Stelle von Axonen akkumuliert, spiegelt eine erhöhte anti-APPA4-Immunreaktivität akuten axonalen Schaden wider.

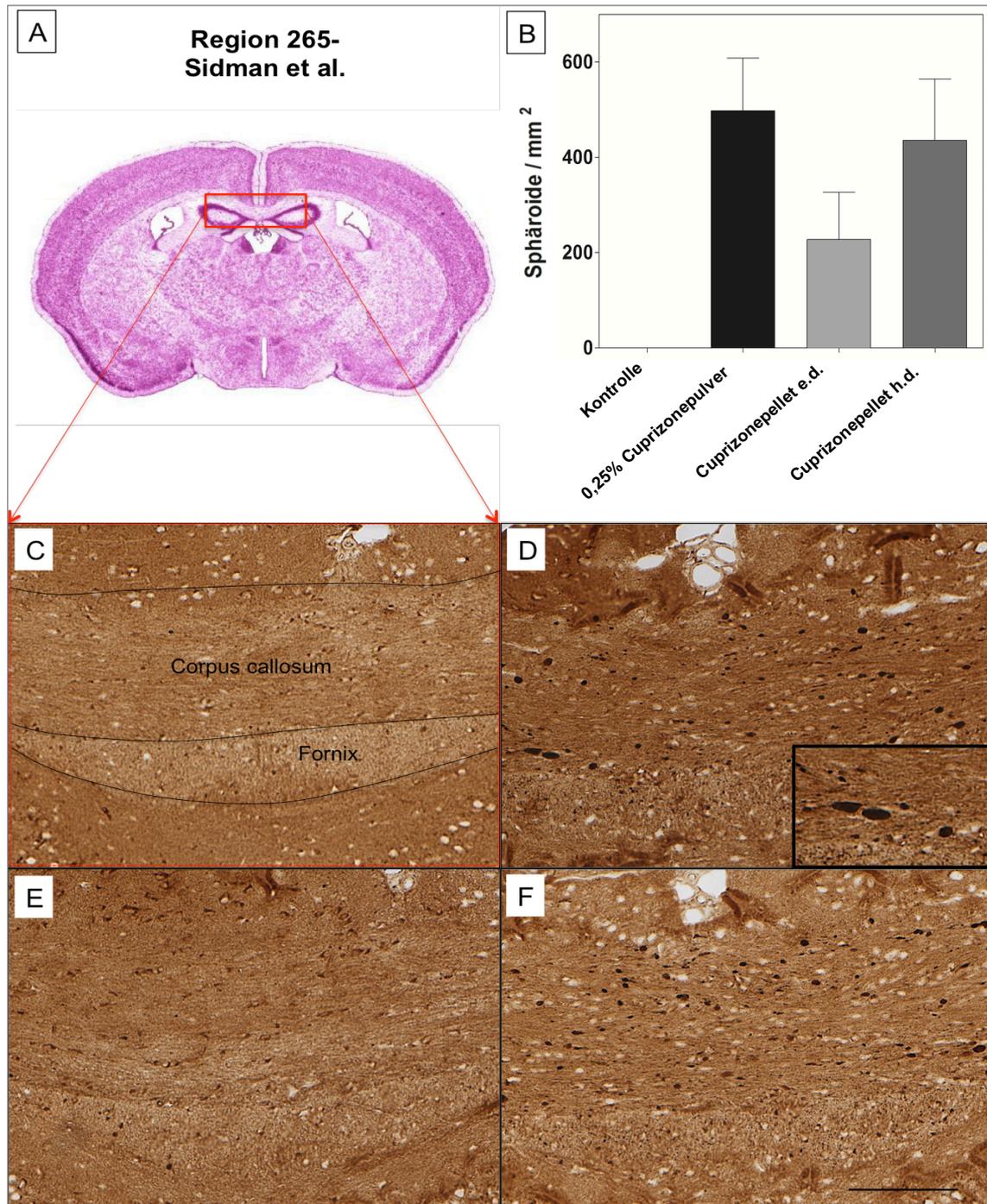


Abbildung 19: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf die Sphäroidendichte im *Corpus callosum* (CC) in Region 265 anhand einer anti-APPA4-Färbung

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen Sphäroidendichte anhand einer anti-APPA4-Färbung **C:** Ein CC von Kontrolltieren ohne nachweisbare Sphäroide **D:** Stark erhöhte Sphäroidendichte im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** leicht erhöhte Sphäroidendichte im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Mittelstark bis stark erhöhte Sphäroidendichte im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

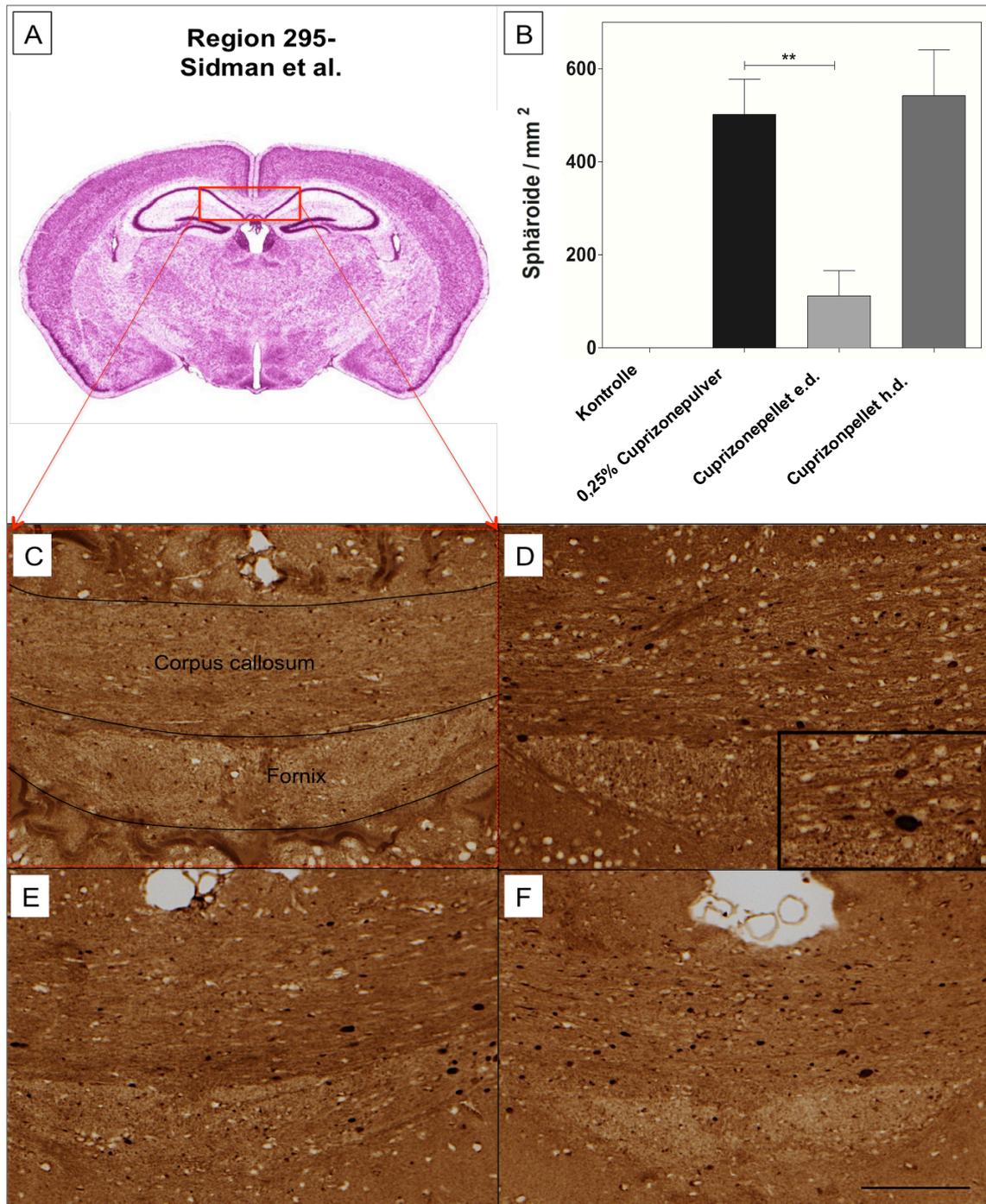


Abbildung 20: Auswirkung unterschiedlicher Applikationsformen auf die Sphäroidendichte im Corpus callosum (CC) in Region 295 anhand einer anti-APP4-Färbung

A: Der umrahmte Bereich im CC des koronaren Gehirnschnittes stellt das in den fotografischen Abbildungen dargestellte Areal dar **B:** Beurteilung der von der Applikationsform abhängigen Sphäroidendichte anhand einer anti-APP4-Färbung **C:** Ein CC von Kontrolltieren ohne nachweisbare Sphäroide. **D:** Stark erhöhte Sphäroidendichte im CC von Pulver-behandelten Tieren **E:** Leicht erhöhte Sphäroidendichte im CC von Pellet e.d.-behandelten Tieren **F:** Stark erhöhte Sphäroidendichte im CC von Pellet h.d.-behandelten Tieren (Maßstab=100µm)

4 Diskussion

Mit dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Applikationsform von Cuprizone das Ausmaß von Cuprizone-induzierten Pathologien beeinflusst. Augenmerk lag bei dieser Vergleichsstudie auf den bereits bekannten Cuprizone-induzierten Veränderungen wie Demyelinisierung, Astrozytose, Mikrogliose und akuter axonaler Schaden.

Die niedrigere LFB-Färbintensität und anti-PLP-Immunreaktivität nach Pulverfütterung als nach Pelletfütterung wurde als stärkere Demyelinisierung interpretiert; die höhere anti-IBA1-Immunreaktivität als stärkere Mikrogliose und die höhere Sphäroidendichte als stärkerer akuter axonaler Schaden. Die erhobenen Daten belegen demnach, dass eine Pulverbehandlung eine reproduzierbare, vollständige Demyelinisierung sowie eine reproduzierbare ausgeprägte Mikrogliose und axonalen Schaden im CC von C57BL/JRj6-Mäusen induziert.

Interessanterweise führten alle Applikationsformen zu einer vergleichbaren anti-ALDH1L1-Immunreaktivität. Da diese als Korrelat für Astrozytose interpretiert wurde, stellt dies den einzigen untersuchten Parameter dar, der kaum fütterungsabhängige Unterschiede aufwies.

Die Verabreichung von Cuprizonepulver bleibt deshalb in Bezug auf Effektivität die Methode der Wahl, obwohl die Herstellung aufwendig ist und ein mögliches Gesundheitsrisiko für beteiligte Personen birgt.

4.1 Der Wirkmechanismus von Cuprizone

Obwohl Cuprizone eine vergleichsweise einfache Strukturformel besitzt, konnte der genaue Wirkmechanismus von Cuprizone nach jahrelanger Forschung nicht abschließend geklärt werden.

Bereits zu Beginn der Forschungsarbeiten wurden nach Verabreichung von Cuprizone niedrige Kupferspiegel bei Mäusen beobachtet (Nilsson 1950, Kesterson and Carlton 1971, Pattison and Jebbett 1971, Ludwin 1978). Ob die toxischen Eigenschaften auf eine Chelatierung mit Kupfer oder anderen Schwermetallen wie beispielsweise Eisen, Zink oder Mangan (Hoppel and Tandler 1973, Zatta, Raso et al. 2005) zurückzuführen sind, ist weiterhin unklar. Dass Mangelzustände dieser Stoffe jedoch keine vergleichbaren morphologischen oder histopathologischen Veränderungen hervorrufen und die Gabe von Kupfer die Toxizität von Cuprizone nicht aufheben kann (Carlton 1967), stellen diese Hypothese in Frage. Vielfach untersucht ist der Einfluss von Cuprizone auf Mitochondrien. Einige Studien belegen eine durch Cuprizone-induzierte Formation von

Megamitochondrien in Leber und Gehirn (Hiremath, Saito et al. 1998, Biancotti, Kumar et al. 2008, Acs and Komoly 2012). Diese entstehen durch Vergrößerung, Fusion oder Inhibierung von Zellteilung (Suzuki and Kikkawa 1969, Tandler and Hoppel 1973). Mitochondriale Veränderungen beschränken sich jedoch nicht nur auf die Morphologie des Zellorganells, sondern betreffen ferner zugehörige Enzyme wie Cytochrom-C-Oxidase und Monoaminoxidase (Venturini 1973). Die Hauptfunktion von Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie über die Atmungskette. Folglich ist davon auszugehen, dass die durch Cuprizone ausgelöste mitochondriale Dysfunktion oxidativen Stress in Oligodendrozyten auslöst, welcher dann zu Zelltod und Demyelinisierung führt (Matsushima and Morell 2001, Binder, Cate et al. 2008).

Interessanter Weise stellten Benardais und Kollegen fest, dass Cuprizone *in vitro* die Anzahl von reifen Oligodendrozyten reduziert, während das Überleben von Mikroglia und Astrozyten unbeeinflusst blieb (Benardais, Kotsiari et al. 2013). Die Ursache der selektiven Toxizität von Cuprizone gegenüber Oligodendrozyten ist bislang nicht vollständig verstanden. Ein möglicher Erklärungsansatz sind jedoch Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA) mit konsekutiv „gestressten“ Oligodendrozyten und erhöhten Spiegeln reaktiver Sauerstoffspezies (Wang, Wu et al. 2013). Oligodendrozyten weisen im Vergleich zu anderen Zellreihen eingeschränkte Reparaturmechanismen für mtDNA auf (Hollensworth, Shen et al. 2000) und könnten daher anfälliger für Cuprizone-induzierte Veränderungen sein. Da die Anzahl von Mitochondrien an den Energiebedarf der jeweiligen Zellen angepasst ist, könnte die Vulnerabilität von Oligodendrozyten ebenfalls auf den enormen Energiebedarf zurückgeführt werden.

4.2 Die kontroverse Rolle beteiligter Zellpopulationen und ihr Zusammenspiel

Warum führt die Verabreichung von Cuprizone trotz der selektiven Oligodendrozytotoxizität zu Mikrogliose und Astrozytose?

Oligodendrozyten, Mikroglia und Astrozyten bilden ein komplexes Netzwerk aus protektiven und destruktiven Eigenschaften. Die ursprünglich bekannten Hauptfunktionen dieser ZNS-Zellen konnten durch viele Forschungsarbeiten erweitert werden – Mikroglia sind nicht nur Makrophagen, Astrozyten nicht nur Stützzellen und Oligodendrozyten nicht nur Produzenten von Myelinscheiden der Axone.

Oligodendrozyten sezernieren eine Vielzahl von Signalmolekülen, die immunologische Prozesse regulieren (Cannella and Raine 2004, Balabanov, Strand et al. 2007, Merabova, Kaminski et al. 2012, Moyon, Dubessy et al. 2015). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigten „gestresste“ Oligodendrozyten zum Beispiel eine vermehrte Expression von Interleukin-6 (IL-6) (Scheld, Fragoulis et al. 2018). Diese Daten unterstützen die Annahme, dass geschädigte Oligodendrozyten in der Lage sind mittels verschiedener

Chemokine und Zytokine, wie zum Beispiel IL-6, Mikrogliazellen zu rekrutieren. Barnett und Kollegen stützen diese Theorie, indem sie in physiologisch erscheinender weißer Substanz MS-Erkrankter, Bereiche mit ausgeprägter Oligodendrozytenapoptose ohne Anwesenheit von Immunzellinfiltraten feststellten (Barnett and Prineas 2004). Dies stützt die Annahme, dass die Schädigung von Oligodendrozyten zur Infiltration von Immunzellen führt und der Entzündungsreaktion vorausgeht. Buschmann und Kollegen beobachteten eine frühzeitige Cuprizone-induzierte Mikrogliose und Oligodendrozytenschädigung ohne Demyelinisierung (Buschmann, Berger et al. 2012). Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Beobachtungen von Hiremath und Kollegen (Hiremath, Saito et al. 1998). Demzufolge scheint nicht nur die Schädigung von Oligodendrozyten, sondern auch die Mikrogliaaktivierung der Demyelinisierung voranzugehen. Auch wenn die zeitliche Abfolge von Mikrogliainvasion und Demyelinisierung mehrfach bestätigt werden konnte, (Skripuletz, Bussmann et al. 2010) sind weitere Studien zur abschließenden Klärung des zeitlichen Aktivierungsmusters sowie Identifikation ihres zellulären Ursprungs und deren Einfluss auf Neuroinflammation erforderlich.

Eine *in vitro* Studie stützt die bereits von Hiremath und Kollegen aufgestellte These, dass Mikroglia aktiv an der Schädigung von Myelin und Oligodendrozyten beteiligt sein könnten. Cuprizone konnte seine Toxizität gegen Oligodendrozyten lediglich in Anwesenheit von Tumornekrose Faktor alpha (TNF- α) und Interferon gamma (IFN- γ) entfalten (Pasquini, Calatayud et al. 2007). Beide Zytokine werden von aktivierten Mikroglia sezerniert. Ein weiterer von Mikroglia produzierter Botenstoff ist Interleukin 1 β (IL-1 β) (Liberto, Albrecht et al. 2004). Bereits fünfzehn Minuten nach einer traumatischen Schädigung des ZNS konnte IL-1 β nachgewiesen werden (Herx, Rivest et al. 2000). Mikroglia können ohne nachweisbare neuropathologische Veränderungen aktiviert werden und scheinen sensibel auf metabolischen Stress zu reagieren (Raivich, Bohatschek et al. 1999). Eine ebenso sensible Reaktion dieser Zellen auf Cuprizoneintoxikation ist daher naheliegend. Es ist anzunehmen, dass bereits eine geringe Schädigung, zum Beispiel durch Cuprizonepellets, für die Rekrutierung von Mikroglia ausreichend ist. Dies könnte einen Erklärungsansatz darstellen, warum beide untersuchten Applikationsformen in der Lage waren eine Mikrogliose zu induzieren, die sich in Bezug auf Ausmaß weniger unterschied, als das Ausmaß von Demyelinisierung. Ob eine Verlängerung der Fütterungsdauer mit Cuprizonepellets zu vollständiger Demyelinisierung führt, bleibt spekulativ. Hervorzuheben sind dennoch einige protektive Einflüsse von Mikroglia insbesondere in Bezug auf Remyelinisierung und Inflammation. Beispielsweise verbessert die Phagozytose von „Myelintrümmern“ Remyelinisierungsprozesse (Kotter, Li et al. 2006) und die Sekretion antiinflammatorischer Faktoren (Interleukin 10 (IL-10) und Transforming-Growth-Faktor beta (TGF- β)) dämpft die Entzün

dungsreaktion ein (Boven, Van Meurs et al. 2006).

Das bereits zuvor genannte proinflammatorische Zytokin IL-1 β wird nicht nur von Mikroglia, sondern auch von Astrozyten sezerniert (Mason, Suzuki et al. 2001). Obwohl IL-1 β *in vitro* zytotoxisch für reife Oligodendrozyten ist (Merrill 1991), spielt es für Remyelinisierungsprozesse eine entscheidende Rolle. Mason und Kollegen konnten nachweisen, dass IL-1 β Knockout Mäuse nach Cuprizoneintoxikation signifikant weniger remyelinisieren. Ursächlich schien eine verzögerte Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen, aufgrund mangelnder Expression von Insulin growth factor 1 (IGF-1) (Mason, Suzuki et al. 2001). IGF-1 ist ein von Astrozyten gebildeter Wachstumsfaktor, der für die Differenzierung und Maturation zu myelinproduzierenden Oligodendrozyten erforderlich ist. Astrozyten sind mit 90% die häufigsten Zellen unseres ZNS (He and Sun 2007) und stellen eine bedeutend heterogene Gruppe dar. Basierend auf Zellmorphologie und anatomischer Lage werden sie in zwei Subtypen eingeteilt - protoplasmatische und fibröse Astrozyten. Eine ihrer Hauptfunktionen ist die Aufrechterhaltung der BHS (Liedtke, Edelmann et al. 1996, Abbott 2000). Nicht nur die Zellfortsätze als anatomischer Bestandteil, sondern auch von ihnen sezernierte Moleküle sind die Grundlage ihrer „Wächterfunktion“ zwischen Blutkreislauf und Hirngewebe. Über die Sekretion von TNF α , IL-1 β und IL-6 können Astrozyten beispielsweise während der Inflammation die Permeabilität der BHS steigern (Schwaninger, Sallmann et al. 1999, Didier, Romero et al. 2003, Kim, Kim et al. 2006). GFAP, ein von Astrozyten exprimiertes Intermediärfilament, ist nicht nur für den Erhalt der BHS, sondern auch für Vaskularisation (Liedtke, Edelmann et al. 1996) und Schutz nach traumatischen Verletzungen entscheidend (Nawashiro, Messing et al. 1998, Faulkner, Herrmann et al. 2004). Astrozyten formen Narben um geschädigte ZNS-Bereiche aus dicht verzweigten, filamentösen Fortsätzen (Eng, Reier et al. 1987, Reier and Houle 1988) mit erhöhter Expression von GFAP, Nestin und Vimentin (Norton, Aquino et al. 1992). Diese „Glianarbe“ fungiert als Barriere sich ausbreitender Gewebsschädigung und Schutz vor entzündungsassoziierter Demyelinisierung (Nair, Frederick et al. 2008). Dieser „Narbe“ werden jedoch nicht nur protektive Eigenschaften zugeschrieben. Beispielsweise werden effektive Remyelinisierungsprozesse unterbunden, da Oligodendrozytenvorläuferzellen sie nicht passieren und in demyelinisierte Bereiche migrieren können (Blakemore and Crang 1989, Fok-Seang, Smith-Thomas et al. 1995, Wilby, Muir et al. 1999). Für die von Astrozyten sezernierten Zytokine, FGF-2 und TNF- α , konnten ebenfalls krankheitsfördernde Aspekte nachgewiesen werden. FGF-2 ist ebenso wie IGF-1 für die Proliferation und Vitalität von Oligodendrozyten grundlegend, scheint aber bei Überproduktion durch Astrozyten Remyelinisierung zu beeinträchtigen (Messersmith, Murtie et al. 2000, Nair, Frederick et al. 2008). Die Freisetzung von TNF- α hemmt Neuritenwachs-

tum und schädigt Oligodendrozyten (Neumann, Schweigreiter et al. 2002). Einige Forschungsgruppen bringen ihre destruktiven Auswirkungen in Zusammenhang mit von ihnen produzierten Zytokinen und Chemokinen, die durch Rekrutierung von T-Zellen, Mikroglia und Makrophagen Demyelinisierung verstärken (De Keyser, Laureys et al. 2010). Die multifunktionelle und kontroverse Rolle von Astrozyten und Mikroglia und ihre diversen Beteiligungen während Demyelinisierung, Remyelinisierung und Inflammation sind bislang nur unvollständig verstanden. Astrozyten und Mikroglia sind ein passendes Beispiel für die komplexe Zell-Zell-Interaktion unseres ZNS. Neben direkten Wechselwirkungen wurden viele pro- und antiinflammatorische Moleküle nachgewiesen, die zur Reziprozität beitragen und über protektive oder destruktive Wirkungen entscheiden. Eine Klassifikation in „Freund- und Feindzellen“ ist daher nicht möglich. Die Zell-Zell-Kommunikation könnte jedoch dazu beitragen, dass eine Intoxikation durch Cuprizonepellets genügt, um Signalkaskaden dieses Zusammenspiels zu aktivieren, das Gleichgewicht zu stören und Mikrogliose und Astrozytose auszulösen. Einige Forschungsarbeiten beschäftigten sich unlängst mit zeitlichen Aktivierungsmustern. Es ist möglich, dass die Gabe von Cuprizone zunächst eine Astrozytenaktivierung, Mikrogliose und Oligodendrozytenschädigung induziert und Demyelinisierung das Endprodukt eines komplexen Zusammenspiels dieser aktivierten bzw. geschädigten Zelltypen darstellt. Ob eine verlängerte Fütterungsdauer von Cuprizonepellets eine vollständige Demyelinisierung induziert oder ob andere Faktoren bedingen, dass das Ausmaß von Astrozytose als einziger Parameter nach Pelletgabe der Pulverfütterung ähnelt, ist in nachfolgenden Forschungsarbeiten zu klären.

4.3 Neurodegeneration im Cuprizone-Modell

Axonale Degeneration wurde im Rahmen von MS-Pathologien früh erwähnt, erlangte jedoch in jüngster Zeit wieder mehr Aufmerksamkeit. Ob Degeneration nachfolgende Inflammation bedingt oder umgekehrt, wird kontrovers diskutiert. Da sich bei Untersuchungen an Hirngewebe MS Erkrankter sowohl neurodegenerative als auch inflammatorische Pathologien nachweisen lassen, bleibt das „Ursache-Wirkungs-Prinzip“ weiter unklar.

In Übereinstimmung mit anderen Forschungsarbeiten konnte die vorliegende Arbeit bestätigen, dass axonaler Schaden nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung auftritt. Hierfür wurde die immunhistochemische Färbung gegen APP verwendet. APP ist ein Membranprotein und wird als physiologischer Bestandteil neuronaler Zellen über anterograden axonalen Transport transportiert. In gesundem Gewebe liegt APP im Axon unterhalb der Nachweisgrenze und lässt sich mittels immunhistochemischer Verfahren nicht darstellen. Durch seine Akkumulation an verletztem Gewebe werden, wie

in Punkt 2.8.3 beschrieben, sogenannte „Sphäroide“ histologisch sichtbar. Bereits wenige Minuten nach traumatischen Hirnverletzungen lässt sich APP histologisch nachweisen (Gentleman, Nash et al. 1993) und wird daher als sensiblen Marker für eine akute axonale Verletzung herangezogen.

MS zeichnet sich durch einen plötzlichen Beginn mit rascher klinischer Verschlechterung aus, welche in kurzer Zeit zu erheblichen körperlichen Behinderungen führen kann (Lublin and Reingold 1996). Man nimmt an, dass axonaler Schaden und Synapsendysfunktion das histopathologische Korrelat für bleibende neurologische Defizite bei MS-Erkrankten darstellt (Kornek and Lassmann 1999, Mandolesi, Grasselli et al. 2012, Rossi, Furlan et al. 2012, Zendedel, Beyer et al. 2013). Myelinscheiden sind für den Erhalt axonaler Integrität erforderlich. Die Vulnerabilität demyelinisierter Axone wird beispielsweise auf Schädigungen durch intrinsische und extrinsische Immunzellen (Newman, Woolley et al. 2001, Smith and Lassmann 2002) oder auf einen erhöhten Energiebedarf zurückgeführt (Craner, Newcombe et al. 2004). Aktiv demyelinisierte Läsionen zeigen dementsprechend die stärkste axonale Schädigung. Interessanterweise scheint sich axonale Schädigung jedoch nicht auf demyelinisierte Bereiche zu beschränken. Bereiche um aktive Läsionen wie Areale in physiologisch erscheinender weißer Substanz weisen ebenso axonale Schäden auf (Kutzelnigg, Lucchinetti et al. 2005, Frischer, Bramow et al. 2009). Griffiths und Kollegen beobachteten bei Mäusen mit PLP-DM20-Mangel verdickte und degenerierte Axone bei unauffälliger Struktur der Myelinscheiden (Griffiths, Klugmann et al. 1998). Axonale Schädigung ohne signifikante Demyelinisierung konnten nachfolgende Studien bestätigen (Garbern, Yool et al. 2002). Dass sowohl demyelinisierungsassoziierte, als auch hiervon unabhängige diffuse axonale Schädigung das histopathologische Bild charakterisieren, wird durch eine deutlichere axonale Schädigung bei geringerer Demyelinisierung durch Pellets, insbesondere in höherer Dosierung (h.d.), gestützt. Weitere Studien wiesen eine starke Korrelation zwischen Mikrogliaaktivierung und axonaler Schädigung nach (Ferguson, Matyszak et al. 1997, Trapp, Peterson et al. 1998). Dass bei erhöhter Konzentration in Cuprizonepellets sowohl Mikrogliaaktivierung als auch axonaler Schaden ausgeprägter waren, unterstützen die Annahme, dass Mikroglia über Sekretion von Signalmolekülen zu axonalem Schaden beitragen könnten.

Bislang bestehen keine therapeutischen Optionen, die progrediente körperliche Behinderung MS-Erkrankter verhindern, obwohl sie zur Reduktion der Schubhäufigkeit und Schubintensität führen (Panitch, Miller et al. 2004). Forschungsarbeiten, die insbesondere die komplexen Prozesse in Bezug auf Remyelinisierung und axonalem Schaden entschlüsseln, könnten vielversprechende Grundlagen für zukünftige Medikamente bieten.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich das Cuprizone-Tiermodell eignet, diese Prozesse zu untersuchen. Um Remyelinisierungsprozesse valide zu untersuchen, ist eine prädiktive, vollständige Demyelinisierung zuvor notwendig, welche durch Cuprizonepellets nicht gewährleistet ist.

4.4 Cuprizone als potentiell Toxin für den Menschen

Auch wenn der exakte Wirkmechanismus von Cuprizone ungeklärt ist, sind Interaktionen mit Kupfer und Auswirkungen auf Mitochondrien mit gestörter Zellatmung vielfach belegt.

Da mitochondriale Dysfunktionen bei diversen Erkrankungen der Leber, Niere und neurodegenerativen Erkrankungen nachweisbar sind (Chedid, Jao et al. 1980, Reddy and Reddy 2011), ist eine potentiell toxische Wirkung für den Menschen durch Cuprizone bislang nicht auszuschließen. Obgleich die Cuprizoneexposition bei nicht-menschlichen Primaten, auch nach Erhöhung der Expositionsdauer und Dosis, keine Demyelinisierung auslöste (Chen, Chen et al. 2015), sind bislang keine Studien erfolgt, die diese Ergebnisse bestätigen. Mögliche Intoxikationsfolgen bei weiterer Dosiserhöhung, Fütterung über einen längeren Zeitraum oder Schäden, die sich erst einige Jahre nach Exposition manifestieren sind daher nicht zu vernachlässigen. Das mutmaßliche Risiko für Cuprizone-induzierte Erkrankungen beim Menschen sollte daher nicht unbeachtet bleiben.

Zur Minimierung dieses bislang nicht abzuschätzenden Risikos wurden bereits alternative Applikationsformen etabliert. Eine dieser Möglichkeiten ist das Auflösen von Cuprizone in destilliertem Wasser. Nachteilig ist jedoch die schlechte Löslichkeit der chemischen Verbindung und eine vergleichsweise lang erforderliche Verabreichungsdauer (bis zu neun Monaten) (Zatta et al. 2005). Die Verabreichung von Cuprizoneenthaltender Nahrung/Flüssigkeit, zum Beispiel über Sonden (Zhen, Liu et al. 2017) kann die Verteilung von Cuprizone-haltigem Staub in Streu oder Fell ebenfalls effektiv reduzieren und ermöglicht eine exakte Kontrolle der täglich verabreichten Dosis. Dies erleichtert nicht nur die Reproduktion etwaiger Versuchsreihen, sondern erhöht auch die Validität und Kontrolle der hierdurch gewonnenen Erkenntnisse. Auch wenn auf den ersten Blick die Vorteile zu überwiegen scheinen, muss vor allem bedacht werden, dass diese Methode für die Versuchstiere belastend ist. Man nimmt an, dass Stress die Entstehung und den Krankheitsverlauf von MS maßgeblich beeinflusst (Karagkouni, Alevizos et al. 2013). Meknatkhah und Kollegen konnten diese These durch den Nachweis einer signifikant stärkeren Demyelinisierung bei psychisch und physisch gestressten Tieren stützen (Meknatkhah, Sharif Dashti et al. 2018). Schwachpunkte dieser Methode sind demnach der zeitliche Aufwand, der Tierschutz und die mutmaßliche

Verzerrung von Studienergebnissen. Bei einer Pulverfütterung ist, wie die erhobenen Daten zeigen, bereits eine drei wöchige Fütterung ausreichend, um eine nahezu vollständige Demyelinisierung nachzuweisen, ohne dass die Tiere unnötigem Stress ausgesetzt sind. Ebenso möglich ist die Verabreichung von Cuprizone in Form von industriell hergestellten Pellets (Liu, Belkadi et al. 2010, Soundarapandian, Selvaraj et al. 2011, Steelman, Thompson et al. 2012). Auch wenn für die meisten Forschungsarbeiten die pulverisierte Form des Toxins verwendet wurde, sind bereits Studien mit den genannten Cuprizone-enthaltenden Pellets veröffentlicht worden (Soundarapandian, Selvaraj et al. 2011, Steelman, Thompson et al. 2012, Bai, Sun et al. 2016, Tagge, O'Connor et al. 2016). Während Soundarapandian, Steelman und Kollegen durch eine Fütterung Cuprizone-enthaltender Pellets eine vollständige Demyelinisierung des CCs nachwiesen, berichteten andere Forschungsgruppen von unterschiedlichen Ergebnissen (Hagemeyer, Boretius et al. 2012).

Aufgrund der Variabilität von Cuprizone-induzierten Pathologien stand das Cuprizone-Tiermodell immer wieder in der Kritik, kein geeignetes MS-Forschungsmodell zu sein. Aufgrund der unterschiedlichen Applikationsformen und teilweise unzureichenden/ fehlenden Angaben zum Intoxikationsprotokoll, vergleicht diese Studie die Auswirkungen der am häufigsten verwendeten Applikationsformen (Pulver vs. Pellet), um diese als mögliche Ursache für die genannte Variabilität nachzuweisen.

Im direkten Vergleich zeigte sich bei der Fütterung von Cuprizonepulver eine deutlich konsistentere und somit reproduzierbarere Demyelinisierung, Mikrogliose und axonale Schädigung. Auch nach Dosiserhöhung auf nahezu das Doppelte (Pellets h.d.) waren die Pellets im Vergleich zu Cuprizonepulver, insbesondere in Bezug auf den Demyelinisierungsgrad, weniger effektiv. Ob eine weitere Dosiserhöhung zu vergleichbarer Wirksamkeit führt, bleibt offen und ist in folgenden Studien zu klären. Gründe für die Effizienzunterschiede sind bislang unklar, jedoch werden Erklärungsansätze im Folgenden formuliert.

4.5 Erklärungsansätze für den Wirkungsverlust von Cuprizonepellets

Ursprünglich hielt man Cuprizone für eine empfindliche, instabile chemische Verbindung. Einige Forschungsgruppen konnten diese Hypothese in Frage stellen. Die initial angenommene Wärmesensibilität von Cuprizone zum Beispiel (Groebe, Clarner et al. 2009, Gudi, Gingele et al. 2014), konnten Heckers und Kollegen mit ihren Untersuchungsergebnissen in Frage stellen. Cuprizone konnte durch thermisches Erhitzen auf maximal 121°C nicht inaktiviert werden (Heckers, Held et al. 2017). Im direkten Vergleich zeigten sich keine Unterschiede bezüglich Demyelinisierung und Gliaaktivierung.

Da das Ausmaß der Wärmeentwicklung bei der Produktion von Pellets bislang nicht untersucht wurde, ist dennoch eine Deaktivierung durch Erhitzen oberhalb der untersuchten Temperaturen möglich. Außerdem könnten andere Krafterwirkungen wie zum Beispiel Druck die Effektivitätsminderung erklären. Ebenso war die Destruktion von Cuprizone durch Säureeinwirkung nicht möglich (Stubenrauch 2015), sodass Cuprizone kontrovers zur ursprünglichen Annahme eine stabile chemische Verbindung zu sein scheint. Dass andere Faktoren die geringere Wirksamkeit von Pellets bedingen, wird durch eine toxikologische Untersuchung gestützt, die ergab, dass Cuprizone in Pellets aktiv und intakt war (Hagemeyer, Boretius et al. 2012).

Es ist daher anzunehmen, dass die Wirkungsminderung von Pellets nicht ausnahmslos auf Inaktivierung bei der Herstellung aufgrund von Instabilität zurückzuführen ist. Möglich wäre beispielsweise, dass Cuprizone als fein gemahlene Pulver zusätzlich über die Haut und den Respirationstrakt in den Organismus der Versuchstiere gelangt und dadurch in der Wirksamkeit den Pellets überlegen ist.

Einige Forscher stellten die Theorie auf, dass Cuprizone als freier Ligand in der Lage ist, physiologische Barrieren (Darmepithel, BHS oder die Zellmembran) zu überwinden, um seine toxische Wirkung innerhalb der Zelle (Oligodendrozyten) zu entfalten (Zatta, Raso et al. 2005, Benetti, Ventura et al. 2010). Möglicherweise ist der Verdauungstrakt der Versuchstiere nicht dazu in der Lage, die Pellets vollständig in seine Bestandteile aufzuspalten. Das enthaltene Cuprizone könnte nicht oder nur teilweise durch aktiven/passiven Transport, Endozytose oder Diffusion in die Zellen gelangen. Eine toxikologische Studie, die intaktes Cuprizone in Exkrementen nach Pelletfütterung nachweist, könnte diese Theorie bestätigen. Dies könnte nicht nur eine Erklärung für die Wirkungsminderung liefern, sondern würde auch den angenommenen Vorteil von Pellets (Schutz vor möglichen gesundheitlichen Risiken für den Menschen) entkräften. Denn bei der Käfigreinigung wären an Cuprizoneversuchen beteiligte Personen dem Toxin ähnlich ausgesetzt, wie bei der Cuprizonepulverintoxikation.

Die Herstellung des Pulvers erfolgte täglich frisch, während zwischen industrieller Pelletherstellung und Verabreichung mindestens Wochen vergehen. Dass Cuprizone im Pellet möglichen Wechselwirkungen mit anderen chemischen Verbindungen stärker ausgesetzt ist, wie beispielsweise im Futter enthaltendem Kupfer, scheint naheliegend. Weitere Studien müssen folgen, um die Ursache der Wirkungsminderung von Pellets aufzuklären.

4.6 Einflussfaktoren Cuprizone-induzierter Pathologien

Das Geschlecht stellt bei der MS eine entscheidende Variable in Bezug auf Prädisposition, Krankheitsverlauf und Häufigkeit dar. Frauen erkranken mit 60-75% deutlich häufiger an MS. Eine stärkere zelluläre und humorale Immunität macht Frauen zwar widerstandsfähiger gegen Infektionen als Männer, jedoch anfälliger für Autoimmunerkrankungen (Tan, Peeva et al. 2015). Dieser Sexualdimorphismus wird sowohl bei MS-Erkrankten als auch in Tiermodellen deutlich. Confavreux und Kollegen konnten mit ihrer Studie bezüglich „geschlechtsspezifischer Steroidwirkung auf entzündliche Prozesse der Erkrankung“ belegen, dass es insbesondere im dritten Trimenon einer Schwangerschaft zu einer deutlichen Reduktion der Schubrate kommt (Confavreux, Hutchinson et al. 1998). Diese Schwangerschaftsphase zeichnet sich durch hohe Plasmaspiegel an Östrogen und Progesteron und ein unterdrücktes Immunsystem zum Schutz des Fötus aus. In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass der Einfluss von Sexualhormonen weit über die Auswirkungen auf immunologische Aspekte der Erkrankung hinausgeht – Oligodendrozyten (Khalaj, Yoon et al. 2013), Mikroglia (Wu, Tan et al. 2013) und Astrozyten (Johann and Beyer 2013, Spence, Wisdom et al. 2013) werden ebenfalls beeinflusst. Auch wenn Taylor und Kollegen nach fünf wöchiger Cuprizoneintoxikation eine vollständige Demyelinisierung des CCs beider Geschlechter nachwiesen, wurde eine geringere Demyelinisierung weiblicher Mäuse nach drei Wochen und massive Veränderungen in Bezug auf die Ovulationsphasen beobachtet (Taylor, Gilmore et al. 2010). Es erscheint daher sinnvoll, dass die meisten Forschungsarbeiten mit Cuprizone, ohne Fokus auf geschlechtsspezifische Unterschiede, an männlichen Mäusen durchgeführt werden, um hormonell bedingte, unerwünschte Einflüsse auszuschalten. Neben Geschlecht (Taylor, Gilmore et al. 2009), Sexualhormonen (Patel, Moore et al. 2013) und Gonosomen (Moore, Patel et al. 2013) konnten bereits Gewicht (Leopold, Schmitz et al. 2019), Expositionsdauer, Toxindosis (Hiremath, Saito et al. 1998) sowie psychischer und physischer Stress (Meknatkhah, Sharif Dashti et al. 2018) als entscheidende Faktoren für eine zuverlässige Cuprizone-induzierte Demyelinisierung nachgewiesen werden. Diese Liste konnten im Rahmen dieser Forschungsarbeit um die Applikationsform erweitert werden.

Die Überschneidung von histopathologischen Veränderungen aus dem autoimmunen und degenerativen Formenkreis, Beteiligung von Zellpopulationen mit protektiven wie destruktiven Einflüssen sowie bislang unzufrieden stellenden Therapiemöglichkeiten verdeutlichen die Komplexität der Erkrankung. Umso entscheidender für die Zukunft der MS-Forschung ist die Sicherstellung der Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen, um folgerichtige Rückschlüsse ziehen zu können. Auf den in dieser Arbeit untersuchten Aspekt „Applikationsform“ bezogen, bedeutet dies, dass ein standardisier-

tes Fütterungsprotokoll notwendig ist. Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Cuprizonepulverintoxikation zum aktuellen Zeitpunkt die effektivste und sicherste Methode zur validen Untersuchung von MS-Pathologien mit dem Cuprizon-Modell ist. Zur Reduktion eines möglichen Gesundheitsrisikos für Personen, die mit dem Toxin arbeiten, sollte ein sorgfältiger Umgang mit dem Toxin, das Tragen von Masken und Handschuhen sowie das Vorhandensein von Abzügen zur Verhinderung von Inhalation und Hautkontakt selbstverständlich sein.

5 Zusammenfassung

Eine Cuprizoneintoxikation führt bei Mäusen zu Demyelinisierung, Mikroglia- und Astrozytenaktivierung sowie akuter axonaler Schädigung. Diese Veränderungen sind MS-typische Pathologien, sodass sich das Cuprizone-Tiermodell zu einem wichtigen MS-Forschungsmodell etabliert hat.

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten die Cuprizoneintoxikation herbeizuführen. Für die meisten Forschungsarbeiten wurde Cuprizone in Form von Pulver oder Pellets verwendet. Daher wurde im Rahmen dieser Studie untersucht, ob die Cuprizone-Toxizität von diesen Applikationsformen abhängig ist.

Hierfür wurden Gewebeproben von Versuchstieren nach Cuprizoneintoxikation mit 0,25% Cuprizonepulver, 0,3% Cuprizonepellets (e.d.) und 0,4% Cuprizonepellets (h.d.) aufgearbeitet und in Bezug auf Demyelinisierung, Mikrogliaaktivierung, Astrozytose und axonalen Schaden verglichen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Applikationsform das Ausmaß bekannter Cuprizone-induzierter Pathologien beeinflusst. Eine Intoxikation mittels Cuprizonepellets induziert eine geringere Demyelinisierung, Mikrogliaaktivierung und axonale Schädigung als eine Intoxikation mit Cuprizonepulver.

Cuprizonepulver stellt demnach die Methode der Wahl dar, eine verlässliche und reproduzierbare Demyelinisierung im CC von C57BL/JRj6-Mäusen zu induzieren.

Inwieweit vermeidbare Faktoren für die Effektivitätsminderung von Cuprizone in Form von industriell hergestellten Pellets verantwortlich sind und warum sich das Ausmaß der Astrozytenaktivierung als einziger Parameter zwischen den Versuchsgruppen nicht unterschied, müssen folgende Studien klären.

Literaturverzeichnis

Abbott, N. J. (2000). "Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability." Cell Mol Neurobiol **20**(2): 131-147.

Acs, P., M. Kipp, A. Norkute, S. Johann, T. Clarner, A. Braun, Z. Berente, S. Komoly and C. Beyer (2009). "17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice." Glia **57**(8): 807-814.

Acs, P. and S. Komoly (2012). "Selective ultrastructural vulnerability in the cuprizone-induced experimental demyelination." Ideggyogy Sz **65**(7-8): 266-270.

Antonio, M., F. Patrizia, I. Ilaria and F. Paolo (2008). "A rational approach on the use of sex steroids in multiple sclerosis." Recent Pat CNS Drug Discov **3**(1): 34-39.

Bai, C. B., S. Sun, A. Roholt, E. Benson, D. Edberg, S. Medicetty, R. Dutta, G. Kidd, W. B. Macklin and B. Trapp (2016). "A mouse model for testing remyelinating therapies." Exp Neurol **283**(Pt A): 330-340.

Balabanov, R., K. Strand, R. Goswami, E. McMahon, W. Begolka, S. D. Miller and B. Popko (2007). "Interferon-gamma-oligodendrocyte interactions in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci **27**(8): 2013-2024.

Barnett, M. H. and J. W. Prineas (2004). "Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion." Ann Neurol **55**(4): 458-468.

Benardais, K., A. Kotsiari, J. Skuljec, P. N. Koutsoudaki, V. Gudi, V. Singh, F. Vulinovic, T. Skripuletz and M. Stangel (2013). "Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes." Neurotox Res **24**(2): 244-250.

Benetti, F., M. Ventura, B. Salmini, S. Ceola, D. Carbonera, S. Mammi, A. Zitolo, P. D'Angelo, E. Urso, M. Maffia, B. Salvato and E. Spisni (2010). "Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration." Neurotoxicology **31**(5): 509-517.

Biancotti, J. C., S. Kumar and J. de Vellis (2008). "Activation of inflammatory response by a combination of growth factors in cuprizone-induced demyelinated brain leads to myelin repair." Neurochem Res **33**(12): 2615-2628.

Binder, M. D., H. S. Cate, A. L. Prieto, D. Kemper, H. Butzkueven, M. M. Gresle, T. Cipriani, V. G. Jokubaitis, P. Carmeliet and T. J. Kilpatrick (2008). "Gas6 deficiency increases oligodendrocyte loss and microglial activation in response to cuprizone-induced demyelination." J Neurosci **28**(20): 5195-5206.

Blakemore, W. F. (1972). "Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice." J Neurocytol **1**(4): 413-426.

Blakemore, W. F. and A. J. Crang (1989). "The relationship between type-1 astrocytes, Schwann cells and oligodendrocytes following transplantation of glial cell cultures into demyelinating lesions in the adult rat spinal cord." J Neurocytol **18**(4): 519-528.

Boven, L. A., M. Van Meurs, M. Van Zwam, A. Wierenga-Wolf, R. Q. Hintzen, R. G. Boot, J. M. Aerts, S. Amor, E. E. Nieuwenhuis and J. D. Laman (2006). "Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis." Brain **129**(Pt 2): 517-526.

Brugarolas, P., D. S. Reich and B. Popko (2018). "Detecting Demyelination by PET: The Lesion as Imaging Target." Mol Imaging **17**: 1536012118785471.

Buschmann, J. P., K. Berger, H. Awad, T. Clarner, C. Beyer and M. Kipp (2012). "Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination." J Mol Neurosci **48**(1): 66-76.

Cannella, B. and C. S. Raine (2004). "Multiple sclerosis: cytokine receptors on oligodendrocytes predict innate regulation." Ann Neurol **55**(1): 46-57.

Carey, E. M. and N. M. Freeman (1983). "Biochemical changes in Cuprizone-induced spongiform encephalopathy. I. Changes in the activities of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase, oligodendroglial ceramide galactosyl transferase, and the hydrolysis of the alkenyl group of alkenyl, acyl-glycerophospholipids by plasmalogenase in different regions of the brain." Neurochem Res **8**(8): 1029-1044.

Carlton, W. W. (1966). "Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxalldihydrazone." Toxicol Appl Pharmacol **8**(3): 512-521.

Carlton, W. W. (1967). "Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity." Life Sci **6**(1): 11-19.

Carlton, W. W. (1969). "Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone." Exp Mol Pathol **10**(3): 274-287.

Chedid, A., W. Jao and J. Port (1980). "Megamitochondria in hepatic and renal disease." Am J Gastroenterol **73**(4): 319-324.

Chen, Z., J. T. Chen, M. Johnson, Z. C. Gossman, M. Hendrickson, K. Sakaie, C. Martinez-Rubio, J. T. Gale and B. D. Trapp (2015). "Cuprizone does not induce CNS demyelination in nonhuman primates." Ann Clin Transl Neurol **2**(2): 208-213.

Compston, A. and A. Coles (2002). "Multiple sclerosis." Lancet **359**(9313): 1221-1231.

Confavreux, C., M. Hutchinson, M. M. Hours, P. Cortinovis-Tourniaire and T. Moreau (1998). "Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group." N Engl J Med **339**(5): 285-291.

Craner, M. J., J. Newcombe, J. A. Black, C. Hartle, M. L. Cuzner and S. G. Waxman (2004). "Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8168-8173.

De Keyser, J., G. Laureys, F. Demol, N. Wilczak, J. Mostert and R. Clinckers (2010). "Astrocytes as potential targets to suppress inflammatory demyelinating lesions in multiple sclerosis." Neurochem Int **57**(4): 446-450.

Didier, N., I. A. Romero, C. Creminon, A. Wijkhuisen, J. Grassi and A. Mabondzo (2003). "Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability." J Neurochem **86**(1): 246-254.

Eng, L. F., P. J. Reier and J. D. Houle (1987). "Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue." Prog Brain Res **71**: 439-455.

Evangelou, N., M. M. Esiri, S. Smith, J. Palace and P. M. Matthews (2000). "Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis." Ann Neurol **47**(3): 391-395.

Faulkner, J. R., J. E. Herrmann, M. J. Woo, K. E. Tansey, N. B. Doan and M. V. Sofroniew (2004). "Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury." J Neurosci **24**(9): 2143-2155.

- Ferguson, B., M. K. Matyszak, M. M. Esiri and V. H. Perry (1997). "Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions." Brain **120** (Pt 3): 393-399.
- Filippi, M., M. A. Rocca, F. Barkhof, W. Bruck, J. T. Chen, G. Comi, G. DeLuca, N. De Stefano, B. J. Erickson, N. Evangelou, F. Fazekas, J. J. Geurts, C. Lucchinetti, D. H. Miller, D. Pelletier, B. F. Popescu and H. Lassmann (2012). "Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis." Lancet Neurol **11**(4): 349-360.
- Fok-Seang, J., L. C. Smith-Thomas, S. Meiners, E. Muir, J. S. Du, E. Housden, A. R. Johnson, A. Faissner, H. M. Geller, R. J. Keynes and et al. (1995). "An analysis of astrocytic cell lines with different abilities to promote axon growth." Brain Res **689**(2): 207-223.
- Frischer, J. M., S. Bramow, A. Dal-Bianco, C. F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen and H. Lassmann (2009). "The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains." Brain **132**(Pt 5): 1175-1189.
- Garbern, J. Y., D. A. Yool, G. J. Moore, I. B. Wilds, M. W. Faulk, M. Klugmann, K. A. Nave, E. A. Siermans, M. S. van der Knaap, T. D. Bird, M. E. Shy, J. A. Kamholz and I. R. Griffiths (2002). "Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation." Brain **125**(Pt 3): 551-561.
- Gentleman, S. M., M. J. Nash, C. J. Sweeting, D. I. Graham and G. W. Roberts (1993). "Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury." Neurosci Lett **160**(2): 139-144.
- Ghaiad, H. R., M. M. Nooh, M. M. El-Sawalhi and A. A. Shaheen (2016). "Resveratrol Promotes Remyelination in Cuprizone Model of Multiple Sclerosis: Biochemical and Histological Study." Mol Neurobiol.
- Gingele, S., F. Henkel, S. Heckers, T. M. Moellenkamp, M. W. Hümmert, T. Skripuletz, M. Stangel and V. Gudi (2020). "Delayed Demyelination and Impaired Remyelination in Aged Mice in the Cuprizone Model." Cells **9**(4).
- Goldberg, J., T. Clarner, C. Beyer and M. Kipp (2015). "Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice." J Mol Neurosci **57**(2): 166-175.
- Goto, N. (1987). "Discriminative staining methods for the nervous system: luxol fast blue--periodic acid-Schiff--hematoxylin triple stain and subsidiary staining methods." Stain Technol **62**(5): 305-315.
- Griffiths, I., M. Klugmann, T. Anderson, D. Yool, C. Thomson, M. H. Schwab, A. Schneider, F. Zimmermann, M. McCulloch, N. Nadon and K. A. Nave (1998). "Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin." Science **280**(5369): 1610-1613.
- Groebe, A., T. Clarner, W. Baumgartner, J. Dang, C. Beyer and M. Kipp (2009). "Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrogliosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum." Cerebellum **8**(3): 163-174.
- Gudi, V., S. Gingele, T. Skripuletz and M. Stangel (2014). "Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned." Front Cell Neurosci **8**: 73.
- Hagemeyer, N., S. Boretius, C. Ott, A. Von Streitberg, H. Welpinghus, S. Sperling, J. Frahm, M. Simons, P. Ghezzi and H. Ehrenreich (2012). "Erythropoietin attenuates neurological and histological consequences of toxic demyelination in mice." Mol Med **18**: 628-635.
- Hamada, M. S. and M. H. Kole (2015). "Myelin loss and axonal ion channel adaptations associated with gray matter neuronal hyperexcitability." J Neurosci **35**(18): 7272-7286.
- He, F. and Y. E. Sun (2007). "Glial cells more than support cells?" Int J Biochem Cell Biol **39**(4): 661-665.

- Heckers, S., N. Held, J. Kronenberg, T. Skripuletz, A. Bleich, V. Gudi and M. Stangel (2017). "Investigation of Cuprizone Inactivation by Temperature." Neurotox Res.
- Herx, L. M., S. Rivest and V. W. Yong (2000). "Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor." J Immunol **165**(4): 2232-2239.
- Hiremath, M. M., Y. Saito, G. W. Knapp, J. P. Ting, K. Suzuki and G. K. Matsushima (1998). "Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice." J Neuroimmunol **92**(1-2): 38-49.
- Hollensworth, S. B., C. Shen, J. E. Sim, D. R. Spitz, G. L. Wilson and S. P. LeDoux (2000). "Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress." Free Radic Biol Med **28**(8): 1161-1174.
- Hoppel, C. L. and B. Tandler (1973). "Biochemical effects of cuprizone on mouse liver and heart mitochondria." Biochem Pharmacol **22**(18): 2311-2318.
- Irvine, K. A. and W. F. Blakemore (2008). "Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration." Brain **131**(Pt 6): 1464-1477.
- Johann, S. and C. Beyer (2013). "Neuroprotection by gonadal steroid hormones in acute brain damage requires cooperation with astroglia and microglia." J Steroid Biochem Mol Biol **137**: 71-81.
- Kaether, C., P. Skehel and C. G. Dotti (2000). "Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a two-color video microscopy study in cultured hippocampal neurons." Mol Biol Cell **11**(4): 1213-1224.
- Karagkouni, A., M. Alevizos and T. C. Theoharides (2013). "Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis." Autoimmun Rev **12**(10): 947-953.
- Keegan, B. M. and J. H. Noseworthy (2002). "Multiple sclerosis." Annu Rev Med **53**: 285-302.
- Kesterson, J. W. and W. W. Carlton (1971). "Histopathologic and enzyme histochemical observations of the cuprizone-induced brain edema." Exp Mol Pathol **15**(1): 82-96.
- Khalaj, A. J., J. Yoon, J. Nakai, Z. Winchester, S. M. Moore, T. Yoo, L. Martinez-Torres, S. Kumar, N. Itoh and S. K. Tiwari-Woodruff (2013). "Estrogen receptor (ER) beta expression in oligodendrocytes is required for attenuation of clinical disease by an ERbeta ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(47): 19125-19130.
- Kim, J. H., J. H. Kim, J. A. Park, S. W. Lee, W. J. Kim, Y. S. Yu and K. W. Kim (2006). "Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface." J Biochem Mol Biol **39**(4): 339-345.
- Kipp, M. (2016). "Remyelination strategies in multiple sclerosis: a critical reflection." Expert Rev Neurother **16**(1): 1-3.
- Kipp, M. and W. Baumgartner (2011). "The cuprizone model and multiple sclerosis: disparities and similarities." (Disseration) <http://publications.rwth-aachen.de/record/64260/files/3773.pdf>
- Kipp, M., T. Clarner, J. Dang, S. Copray and C. Beyer (2009). "The cuprizone animal model: new insights into an old story." Acta Neuropathol **118**(6): 723-736.
- Kipp, M., A. Norkus, B. Krauspe, T. Clarner, K. Berger, P. van der Valk, S. Amor and C. Beyer (2011). "The hippocampal fimbria of cuprizone-treated animals as a structure for studying neuroprotection in multiple sclerosis." Inflamm Res **60**(8): 723-726.

- Klein, B., H. Mrowetz, C. M. Barker, S. Lange, F. J. Rivera and L. Aigner (2018). "Age Influences Microglial Activation After Cuprizone-Induced Demyelination." Front Aging Neurosci **10**: 278.
- Kornek, B. and H. Lassmann (1999). "Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note." Brain Pathol **9**(4): 651-656.
- Kotter, M. R., W. W. Li, C. Zhao and R. J. Franklin (2006). "Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation." J Neurosci **26**(1): 328-332.
- Kutzelnigg, A., C. F. Lucchinetti, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Bergmann, M. Schmidbauer, J. E. Parisi and H. Lassmann (2005). "Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis." Brain **128**(Pt 11): 2705-2712.
- Lassmann, H., W. Bruck and C. F. Lucchinetti (2007). "The immunopathology of multiple sclerosis: an overview." Brain Pathol **17**(2): 210-218.
- Leopold, P., C. Schmitz and M. Kipp (2019). "Animal Weight Is an Important Variable for Reliable Cuprizone-Induced Demyelination." J Mol Neurosci **68**(4): 522-528.
- Liberto, C. M., P. J. Albrecht, L. M. Herx, V. W. Yong and S. W. Levison (2004). "Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes." J Neurochem **89**(5): 1092-1100.
- Liedtke, W., W. Edelmann, P. L. Bieri, F. C. Chiu, N. J. Cowan, R. Kucherlapati and C. S. Raine (1996). "GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination." Neuron **17**(4): 607-615.
- Lindner, M., J. Fokuhl, F. Linsmeier, C. Trebst and M. Stangel (2009). "Chronic toxic demyelination in the central nervous system leads to axonal damage despite remyelination." Neurosci Lett **453**(2): 120-125.
- Liu, L., A. Belkadi, L. Darnall, T. Hu, C. Drescher, A. C. Coteleur, D. Padovani-Claudio, T. He, K. Choi, T. E. Lane, R. H. Miller and R. M. Ransohoff (2010). "CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: relevance to multiple sclerosis." Nat Neurosci **13**(3): 319-326.
- Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." Neurology **46**(4): 907-911.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." Ann Neurol **47**(6): 707-717.
- Ludwin, S. K. (1978). "Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity." Lab Invest **39**(6): 597-612.
- Ludwin, S. K. (1980). "Chronic demyelination inhibits remyelination in the central nervous system. An analysis of contributing factors." Lab Invest **43**(4): 382-387.
- Mallucci, G., L. Peruzzotti-Jametti, J. D. Bernstock and S. Pluchino (2015). "The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis." Prog Neurobiol **127-128**: 1-22.
- Mandolesi, G., G. Grasselli, A. Musella, A. Gentile, G. Musumeci, H. Sepman, N. Haji, D. Fresegna, G. Bernardi and D. Centonze (2012). "GABAergic signaling and connectivity on Purkinje cells are impaired in experimental autoimmune encephalomyelitis." Neurobiol Dis **46**(2): 414-424.
- Manrique-Hoyos, N., T. Jurgens, M. Gronborg, M. Kreutzfeldt, M. Schedensack, T. Kuhlmann, C. Schrick, W. Bruck, H. Urlaub, M. Simons and D. Merkler (2012). "Late motor decline after

accomplished remyelination: impact for progressive multiple sclerosis." Ann Neurol **71**(2): 227-244.

Mason, J. L., K. Suzuki, D. D. Chaplin and G. K. Matsushima (2001). "Interleukin-1beta promotes repair of the CNS." J Neurosci **21**(18): 7046-7052.

Matsushima, G. K. and P. Morell (2001). "The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system." Brain Pathol **11**(1): 107-116.

Mei, F., K. Lehmann-Horn, Y. A. Shen, K. A. Rankin, K. J. Stebbins, D. S. Lorrain, K. Pekarek, A. S. S, L. Xiao, C. Teuscher, H. C. von Budingen, J. Wess, J. J. Lawrence, A. J. Green, S. P. Fancy, S. S. Zamvil and J. R. Chan (2016). "Accelerated remyelination during inflammatory demyelination prevents axonal loss and improves functional recovery." Elife **5**.

Meknatkhah, S., P. Sharif Dashti, M. S. Mousavi, A. Zeynali, S. Ahmadian, S. Karima, A. A. Saboury and G. H. Riazi (2018). "Psychological stress effects on myelin degradation in the cuprizone-induced model of demyelination." Neuropathology.

Merabova, N., R. Kaminski, B. Krynska, S. Amini, K. Khalili and A. Darbinyan (2012). "JCV agnoprotein-induced reduction in CXCL5/LIX secretion by oligodendrocytes is associated with activation of apoptotic signaling in neurons." J Cell Physiol **227**(8): 3119-3127.

Merrill, J. E. (1991). "Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro." Dev Neurosci **13**(3): 130-137.

Messersmith, D. J., J. C. Murtie, T. Q. Le, E. E. Frost and R. C. Armstrong (2000). "Fibroblast growth factor 2 (FGF2) and FGF receptor expression in an experimental demyelinating disease with extensive remyelination." J Neurosci Res **62**(2): 241-256.

Miller, D. H., A. J. Thompson and M. Filippi (2003). "Magnetic resonance studies of abnormalities in the normal appearing white matter and grey matter in multiple sclerosis." J Neurol **250**(12): 1407-1419.

Moore, S., R. Patel, G. Hannsun, J. Yang and S. K. Tiwari-Woodruff (2013). "Sex chromosome complement influences functional callosal myelination." Neuroscience **245**: 166-178.

Moyon, S., A. L. Dubessy, M. S. Aigrot, M. Trotter, J. K. Huang, L. Dauphinot, M. C. Potier, C. Kerninon, S. Melik Parsadaniantz, R. J. Franklin and C. Lubetzki (2015). "Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration." J Neurosci **35**(1): 4-20.

Nair, A., T. J. Frederick and S. D. Miller (2008). "Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment." Cell Mol Life Sci **65**(17): 2702-2720.

Nawashiro, H., A. Messing, N. Azzam and M. Brenner (1998). "Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury." Neuroreport **9**(8): 1691-1696.

Neumann, H., R. Schweigreiter, T. Yamashita, K. Rosenkranz, H. Wekerle and Y. A. Barde (2002). "Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism." J Neurosci **22**(3): 854-862.

Newman, T. A., S. T. Woolley, P. M. Hughes, N. R. Sibson, D. C. Anthony and V. H. Perry (2001). "T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases." Brain **124**(Pt 11): 2203-2214.

Nicholas, R. and W. Rashid (2013). "Multiple sclerosis." Am Fam Physician **87**(10): 712-714.

Nilsson, G. J. A. C. S. (1950). A New Colour Reaction on Copper and Certain Carbonyl Compounds, MUNKSGAARD INT PUBL LTD 35 NORRE SOGADE, PO BOX 2148, DK-1016 COPENHAGEN **4**: 205-205.

- Norkute, A., A. Hieble, A. Braun, S. Johann, T. Clarner, W. Baumgartner, C. Beyer and M. Kipp (2009). "Cuprizone treatment induces demyelination and astrogliosis in the mouse hippocampus." J Neurosci Res **87**(6): 1343-1355.
- Norton, W. T., D. A. Aquino, I. Hozumi, F. C. Chiu and C. F. Brosnan (1992). "Quantitative aspects of reactive gliosis: a review." Neurochem Res **17**(9): 877-885.
- Panitch, H., A. Miller, D. Paty and B. Weinschenker (2004). "Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study." Neurology **63**(10): 1788-1795.
- Pasquini, L. A., C. A. Calatayud, A. L. Bertone Una, V. Millet, J. M. Pasquini and E. F. Soto (2007). "The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia." Neurochem Res **32**(2): 279-292.
- Patel, R., S. Moore, D. K. Crawford, G. Hannsun, M. V. Sasidhar, K. Tan, D. Molaie and S. K. Tiwari-Woodruff (2013). "Attenuation of corpus callosum axon myelination and remyelination in the absence of circulating sex hormones." Brain Pathol **23**(4): 462-475.
- Pattison, I. H. and J. N. Jebbett (1971). "Clinical and histological observations on cuprizone toxicity and scrapie in mice." Res Vet Sci **12**(4): 378-380.
- Pfeifenbring, S., S. Nessler, C. Wegner, C. Stadelmann and W. Bruck (2015). "Remyelination After Cuprizone-Induced Demyelination Is Accelerated in Juvenile Mice." J Neuropathol Exp Neurol **74**(8): 756-766.
- Pittock, S. J. and C. F. Lucchinetti (2007). "The pathology of MS: new insights and potential clinical applications." Neurologist **13**(2): 45-56.
- Popescu, B. F. and C. F. Lucchinetti (2012). "Pathology of demyelinating diseases." Annu Rev Pathol **7**: 185-217.
- Raivich, G., M. Bohatschek, C. U. Kloss, A. Werner, L. L. Jones and G. W. Kreutzberg (1999). "Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function." Brain Res Brain Res Rev **30**(1): 77-105.
- Reddy, P. H. and T. P. Reddy (2011). "Mitochondria as a therapeutic target for aging and neurodegenerative diseases." Curr Alzheimer Res **8**(4): 393-409.
- Reier, P. J. and J. D. Houle (1988). "The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair." Adv Neurol **47**: 87-138.
- Rossi, L., M. F. Lombardo, M. R. Ciriolo and G. J. N. r. Rotilio (2004). "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance." **29**(3): 493-504.
- Rossi, S., R. Furlan, V. De Chiara, C. Motta, V. Studer, F. Mori, A. Musella, A. Bergami, L. Muzio, G. Bernardi, L. Battistini, G. Martino and D. Centonze (2012). "Interleukin-1beta causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis." Ann Neurol **71**(1): 76-83.
- Scheld, M., A. Fragoulis, S. Nyamoya, A. Zendedel, B. Denecke, B. Krauspe, N. Teske, M. Kipp, C. Beyer and T. Clarner (2018). "Mitochondrial Impairment in Oligodendroglial Cells Induces Cytokine Expression and Signaling." J Mol Neurosci.
- Schmidt, T., H. Awad, A. Slowik, C. Beyer, M. Kipp and T. Clarner (2013). "Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: topographical aspects of the midline of the corpus callosum." J Mol Neurosci **49**(1): 80-88.
- Schwanger, M., S. Sallmann, N. Petersen, A. Schneider, S. Prinz, T. A. Libermann and M. Spranger (1999). "Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB." J Neurochem **73**(4): 1461-1466.

Sherriff, F. E., L. R. Bridges, S. M. Gentleman, S. Sivaloganathan and S. Wilson (1994). "Markers of axonal injury in post mortem human brain." Acta Neuropathol **88**(5): 433-439.

Skripuletz, T., J. H. Bussmann, V. Gudi, P. N. Koutsoudaki, R. Pul, D. Moharreggh-Khiabani, M. Lindner and M. Stangel (2010). "Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model." Brain Pathol **20**(2): 301-312.

Smith, K. J. and H. Lassmann (2002). "The role of nitric oxide in multiple sclerosis." Lancet Neurol **1**(4): 232-241.

Soundarapandian, M. M., V. Selvaraj, U. G. Lo, M. S. Golub, D. H. Feldman, D. E. Pleasure and W. Deng (2011). "Zfp488 promotes oligodendrocyte differentiation of neural progenitor cells in adult mice after demyelination." Sci Rep **1**: 2.

Spence, R. D., A. J. Wisdom, Y. Cao, H. M. Hill, C. R. Mongerson, B. Stapornkul, N. Itoh, M. V. Sofroniew and R. R. Voskuhl (2013). "Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ERalpha signaling on astrocytes but not through ERbeta signaling on astrocytes or neurons." J Neurosci **33**(26): 10924-10933.

Steelman, A. J., J. P. Thompson and J. Li (2012). "Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication." Neurosci Res **72**(1): 32-42.

Stidworthy, M. F., S. Genoud, U. Suter, N. Mantei and R. J. Franklin (2003). "Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone-induced demyelination." Brain Pathol **13**(3): 329-339.

Stone, J. R., R. H. Singleton and J. T. Povlishock (2000). "Antibodies to the C-terminus of the beta-amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic axonal injury." Brain Res **871**(2): 288-302.

Strausak, D., J. F. Mercer, H. H. Dieter, W. Stremmel and G. Multhaup (2001). "Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases." Brain Res Bull **55**(2): 175-185.

Stubenrauch, J. A. (2015). Mono-und ditope Rezeptoren: Synthese, Bindungsstudien und kooperative Effekte, Universitätsbibliothek der RWTH Aachen.

Suzuki, K. and Y. Kikkawa (1969). "Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone)." Am J Pathol **54**(2): 307-325.

Tagge, I., A. O'Connor, P. Chaudhary, J. Pollaro, Y. Berlow, M. Chalupsky, D. Bourdette, R. Woltjer, M. Johnson and W. Rooney (2016). "Spatio-Temporal Patterns of Demyelination and Remyelination in the Cuprizone Mouse Model." PLoS One **11**(4): e0152480.

Tan, I. J., E. Peeva and G. Zandman-Goddard (2015). "Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens." Autoimmun Rev **14**(6): 536-542.

Tandler, B. and C. L. Hoppel (1973). "Division of giant mitochondria during recovery from cuprizone intoxication." J Cell Biol **56**(1): 266-272.

Taylor, L. C., W. Gilmore and G. K. Matsushima (2009). "SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination." Brain Pathol **19**(3): 467-479.

Taylor, L. C., W. Gilmore, J. P. Ting and G. K. Matsushima (2010). "Cuprizone induces similar demyelination in male and female C57BL/6 mice and results in disruption of the estrous cycle." J Neurosci Res **88**(2): 391-402.

- Tejedor, L. S., T. Wostradowski, S. Gingele, T. Skripuletz, V. Gudi and M. Stangel (2017). "The Effect of Stereotactic Injections on Demyelination and Remyelination: a Study in the Cuprizone Model." J Mol Neurosci **61**(4): 479-488.
- Torkildsen, O., L. A. Brunborg, K. M. Myhr and L. Bo (2008). "The cuprizone model for demyelination." Acta Neurol Scand Suppl **188**: 72-76.
- Trapp, B. D. and K. A. Nave (2008). "Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?" Annu Rev Neurosci **31**: 247-269.
- Trapp, B. D., J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mork and L. Bo (1998). "Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis." N Engl J Med **338**(5): 278-285.
- Vakilzadeh, G., F. Khodagholi, T. Ghadiri, M. Darvishi, A. Ghaemi, F. Noorbakhsh, A. Gorji and M. Sharifzadeh (2015). "Protective Effect of a cAMP Analogue on Behavioral Deficits and Neuropathological Changes in Cuprizone Model of Demyelination." Mol Neurobiol **52**(1): 130-141.
- Vakilzadeh, G., F. Khodagholi, T. Ghadiri, A. Ghaemi, F. Noorbakhsh, M. Sharifzadeh and A. Gorji (2016). "The Effect of Melatonin on Behavioral, Molecular, and Histopathological Changes in Cuprizone Model of Demyelination." Mol Neurobiol **53**(7): 4675-4684.
- Venturini, G. (1973). "Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo." J Neurochem **21**(5): 1147-1151.
- Wagenknecht, N., B. Becker, M. Scheld, C. Beyer, T. Clarner, T. Hochstrasser and M. Kipp (2016). "Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models." J Mol Neurosci **60**(1): 102-114.
- Wagner, T. and J. Rafael (1977). "Biochemical properties of liver megamitochondria induced by chloramphenicol or cuprizone." Exp Cell Res **107**(1): 1-13.
- Wang, C. H., S. B. Wu, Y. T. Wu and Y. H. Wei (2013). "Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging." Exp Biol Med (Maywood) **238**(5): 450-460.
- Werner, S. R., J. K. Saha, C. L. Broderick, E. Y. Zhen, R. E. Higgs, K. L. Duffin and R. C. Smith (2010). "Proteomic analysis of demyelinated and remyelinating brain tissue following dietary cuprizone administration." J Mol Neurosci **42**(2): 210-225.
- Wilby, M. J., E. M. Muir, J. Fok-Seang, B. J. Gour, O. W. Blaschuk and J. W. Fawcett (1999). "N-Cadherin inhibits Schwann cell migration on astrocytes." Mol Cell Neurosci **14**(1): 66-84.
- Wu, W. F., X. J. Tan, Y. B. Dai, V. Krishnan, M. Warner and J. A. Gustafsson (2013). "Targeting estrogen receptor beta in microglia and T cells to treat experimental autoimmune encephalomyelitis." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(9): 3543-3548.
- Zatta, P., M. Raso, P. Zambenedetti, W. Wittkowski, L. Messori, F. Piccioli, P. L. Mauri and M. Beltramini (2005). "Copper and zinc dismetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment." Cell Mol Life Sci **62**(13): 1502-1513.
- Zendedel, A., C. Beyer and M. Kipp (2013). "Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection." J Mol Neurosci **51**(2): 567-572.
- Zhen, W., A. Liu, J. Lu, W. Zhang, D. Tattersall and J. Wang (2017). "An Alternative Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination Mouse Model." ASN Neuro **9**(4): 1759091417725174.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich den Menschen meinen herzlichsten Dank aussprechen, deren Unterstützung einen nicht zu unterschätzenden Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit beisteuerte.

Allen voran gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, für die Betreuung meiner Promotion. Stets stand er mir nicht nur akademisch, sondern auch persönlich mit Rat und Tat zur Seite. Bei der Durchführung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchsreihen, deren Ergebnisauswertung, der wissenschaftlich fundierten schriftlichen Strukturierung in Form der vorliegenden Abhandlung und natürlich auch bei der sich anschließenden Korrektur, brachte mir Herr Prof. Kipp ein Maß an Respekt und Geduld entgegen, welches für das Gelingen meiner Promotion von unschätzbarem Wert war. Zu jeder Zeit seiner Betreuung konnte ich mich auf seine wissenschaftlichen Anreize und seine konstruktive Kritik verlassen. Diese Tatsache hat mich sowohl fachlich als auch persönlich motiviert. Dafür und für vieles mehr möchte ich mich nochmal und in aller Form bedanken.

Nun liegt es in der Natur der Sache, dass bei einer Arbeit dieser Form noch weit mehr Menschen, jeder auf seine oder ihre Art, einen Beitrag leisteten, dass auch diese Erwähnung finden müssen und sollen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz und allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen seines Lehrstuhles II der Neuroanatomie, an welchem ich das Glück hatte promovieren zu dürfen. Für die Unterstützung und die Zeit gebührt ihnen mein Dank.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meine Betreuerin Frau Dr. Tanja Hochstrasser hervorheben, die mir ebenso wie Herr Prof. Kipp in jeder Phase meiner Doktorarbeit kompetent und mit Geduld zur Seite stand. Ein Gelingen ohne ihre Hilfe und außerordentlichen Einsatz wäre nur schwer vorstellbar gewesen. Ihre Unterstützung ging weit über das normale und zu erwartende Maß hinaus und dafür kann mich nur von Herzen bedanken.

Einen für mich persönlich nicht minderen Teil zu meiner Promotion trugen meine Familie und Freunde bei. Über den gesamten Zeitraum durfte ich ihre Geduld, Unterstützung und auch Liebe erfahren, ohne welche es mir nicht in gleicher Form möglich gewesen wäre, meine Promotion zu erlangen und damit einen wichtigen Schritt meiner Ausbildung zu gehen.

Eidesstattliche Versicherung

Exner, Gianna

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Abhängigkeit der Cuprizone-Toxizität von der Applikationsform“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Freiburg, den 19.04.2021

Ort, Datum

Gianna Exner

Unterschrift Doktorand