

Aus dem Institut für Neuroanatomie Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

**Der Vergleich dreidimensionaler  
Rekonstruktionen des axonalen Schadens  
im Cuprizon-Modell**

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

vorgelegt von Franziska Kramer  
aus Mannheim

2021

Berichterstatter: Univ. Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Markus Kipp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Priv. Doz. Dr. Markus Krumbholz

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1 Die Multiple Sklerose .....	10
1.2 Das Cuprizone-Modell .....	15
1.3 Der axonale Schaden bei der MS .....	17
1.4 Technik der dreidimensionalen Analyse des akuten, axonalen Schadens .....	19
<b>2. Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>21</b>
3.1 Erstellung der immunfluoreszierenden (IF) Daten .....	22
3.1.1 Versuchsaufbau.....	22
3.1.2 Versuchstiere .....	24
3.1.3 Histologische Untersuchung des Materials.....	31
3.2 Auswertung der IF- und elektronenmikroskopischen (EM)-Daten .....	41
3.2.1 Analyseverfahren der IF-Daten.....	41
3.2.2 Analyseverfahren der EM-Daten .....	50
3.2.3 Berechnung eines Umrechnungsfaktors zwischen den IF- und den EM-Daten.....	53
3.2.4 Festlegung weiterer Einschlusskriterien anhand der Nebenachse.....	55
3.2.5 Volumenberechnung der Sphäroide.....	57
3.2.6 Erstellung von Klassen anhand der Nebenachse der APPA4-positiven Sphäroide in den IF-Daten .....	59
3.3 Untersuchung der Formen des akuten, axonalen Schadens .....	59
3.3.1 Analyse der Formen des axonalen Schadens anhand der IF-Daten .....	59
3.3.2 Deskriptive Analyse der Formen des axonalen Schadens anhand der EM-Daten .....	60
3.3.3 Dreidimensionale Rekonstruktion von Axonen der Versuchs- und Kontrolltiere aus den EM-Daten mit BioVis3D® .....	60
3.4 Quantitative Analyse der degenerierten Axone pro Fläche .....	61
3.5 Statistische Auswertung.....	62
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
4.1 Die Volumina der Sphäroide in den IF- und EM-Daten.....	63
4.1.1 Die Einbettung mit Kryo und Kunstharz resultiert in Volumenveränderungen der Sphäroide .....	64
4.1.2 Die Mehrheit der Sphäroide weisen eine Nebenachse von 1 bis 4 µm auf .....	67
Mit dem nun vorhandenen Umrechnungsfaktor und dem definierten Einschlusskriteriums der Nebenachse von 1 µm bis 4 µm konnte im Folgenden die Volumina der beiden Datensätze ermittelt werden. ....	69
4.1.3 Die Vergleichsgruppen weisen unterschiedliche Volumina auf .....	69
4.2 Die Vergleichsgruppen weisen ähnliche räumliche Formen des akuten, axonalen Schadens auf.....	80

4.2.2 Der akute, axonale Schaden der EM-Daten nimmt ähnliche, räumlichen Formen wie bei den IF-Präparaten an .....	84
4.2.3 Dreidimensionale Rekonstruktionen zeigen ähnliche räumliche Formen wie die zweidimensionale Analyse .....	88
In einem letzten Schritt wurde die Anzahl der degenerierte Axone im EM-Datensatz vom Versuchs- und Kontrolltieren verglichen. ....	89
4.3 Die Anzahl der degenerierten Axone in den Versuchstieren ist verglichen mit den Axonen der Kontrolltiere stark erhöht.....	90
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>92</b>
5.1 Tiermodelle stellen eine geeignete Untersuchungsmethode in der MS-Forschung dar .....	93
5.2 Der akute axonale Schaden stellt ein primäres Phänomen der MS dar.....	94
5.3 Defizite des anterograden Transports lassen sich durch die Visualisierung von APPA4-Akkumulationen darstellen und analysieren.....	96
5.4 Der akute, axonale Schaden lässt sich in der räumlichen Darstellung von Sphäroiden in IF- und EM-Daten vergleichen.....	97
5.4.1 Die Erstellung eines Umrechnungsfaktors zwischen IF- und EM-Daten.....	97
5.4.2 Einschlusskriterien für den Vergleich der Volumina .....	97
5.4.3 Der Vergleich der Volumina von IF- und EM-Daten.....	98
5.4.4 Der Vergleich von IF- und EM-Daten anhand von Größenklassen .....	99
5.5 Die dreidimensionale Gestalt der Sphäroide nimmt in IF- und EM-Daten ähnliche Formen an.....	100
5.6 Der akute axonale Schaden führt zu degenerierten Axonen .....	100
5.7 Ausblick .....	102
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>110</b>
8.1 Danksagung.....	110
8.2 Eidesstattliche Erklärung der Promotionsordnung.....	111
8.3 Lebenslauf.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: IMMUNMODULATORISCHE STUFENTHERAPIE DER MS (MODIFIZIERT NACH DGN- UND KKNMS-LEITLINIEN, STAND: AUGUST 2014; <a href="http://WWW.DGN.ORG/LEITLINIEN/2333-LL-31-2012-DIAGNOSE-UND-THERAPIE-DER-MULTIPLLEN-SKLEROSE">WWW.DGN.ORG/LEITLINIEN/2333-LL-31-2012-DIAGNOSE-UND-THERAPIE-DER-MULTIPLLEN-SKLEROSE</a> ) .....	14
ABBILDUNG 2: REGION 265 IN FRONTALANSICHT (SIDMAN ET AL.) .....	30
ABBILDUNG 3: REGION 275 IN FRONTALANSICHT (SIDMAN ET AL.) .....	30
ABBILDUNG 4: REGION 285 IN FRONTALANSICHT (SIDMAN ET AL.) .....	30
ABBILDUNG 5: REGION 295 IN FRONTALANSICHT (SIDMAN ET AL.) .....	31
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ROI .....	43
ABBILDUNG 7: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER IF-PRÄPARATE MIT MARKIERTEN ROI .....	43
ABBILDUNG 8: ROI NR.1 IN DEM SCAN DER IF-FREE-FLOATING- APPA4-FÄRBUNG IN 40-FACHER VERGRÖßERUNG. ....	44
ABBILDUNG 9: SIGNAL-EINSTELLUNG: SENSITIVITÄT DER SOMADETEKTION (1) .....	45
ABBILDUNG 10: SIGNAL-EINSTELLUNG: SENSITIVITÄT DER SOMADETEKTION (2) .....	45
ABBILDUNG 11: SIGNAL-EINSTELLUNG: SENSITIVITÄT DER SOMADETEKTION (3) .....	45
ABBILDUNG 12: KONTROLLE AUF VOLLSTÄNDIGKEIT DER ZIELSTRUKTUREN MIT NEUROLUCIDA360® .....	46
ABBILDUNG 13: KONTROLLE AUF VOLLSTÄNDIGKEIT DER ZIELSTRUKTUREN MIT NEUROLUCIDA360® (2) .....	46
ABBILDUNG 14: DETEKTION VON ZIELSTRUKTUREN MIT NEUROLUCIDA360® .....	47
ABBILDUNG 15: MESSUNG DER NEBENACHSE DER SPHÄROIDE .....	48
ABBILDUNG 16: KONTROLLE AUF VOLLSTÄNDIGKEIT DER ZIELSTRUKTUREN MIT NEUROLUCIDAEXPLORER® .....	48
ABBILDUNG 17: KONTROLLE AUF VOLLSTÄNDIGKEIT DER ZIELSTRUKTUR MIT NEUROLUCIDAEXPLORER® .....	49
ABBILDUNG 18: ANALYSE DER MARKIERTEN ZIELSTRUKTUREN MIT NEUROLUCIDAEXPLORER® .....	49
ABBILDUNG 19: AUSMESSEN DER NEBENACHSE MIT NEUROLUCIDA360® .....	50
ABBILDUNG 20: SKALIERUNG DES PROGRAMMS IMAGEJ® .....	52
ABBILDUNG 21: EINSCHLUSSKRITERIUM: VOLLSTÄNDIG ERFASSTE ZELLKERNE .....	54
ABBILDUNG 22: MESSUNG DER NEBENACHSE DES ZELLKERNS MIT IMAGEJ® .....	55
ABBILDUNG 23: EINSCHLUSSKRITERIUM: VOLLSTÄNDIG ERFASSTE SPHÄROIDE .....	56
ABBILDUNG 24: MESSEN DER NEBENACHSE DES SPHÄROIDS MIT IMAGEJ® .....	57
ABBILDUNG 25: VOLUMEN-BERECHNUNG DER SPHÄROIDE IN DEN EM-DATEN MIT IMAGEJ® .....	58
ABBILDUNG 26: BEISPIEL EINES SPHÄROIDS DER EM-DATEN MIT ERKENNBAREN ZELLORGANELLEN .....	61
ABBILDUNG 27: UNTERSCHIEDUNG VON DEGENERIERTEN UND GESUND ERSCHEINENDEN AXONEN .....	62
ABBILDUNG 28: DIE NEBENACHSE ZELLKERNE IN DEN IF-PRÄPARATEN .....	64
ABBILDUNG 29: DIE NEBENACHSE DER ZELLKERNE IN DEN EM-DATEN .....	65
ABBILDUNG 30: VERGLEICH DER NEBENACHSEN DER ZELLKERNE IN DEN IF-PRÄPARATEN UND DEN EM-DATEN IN µM .....	67
ABBILDUNG 31: DIE NEBENACHSE DER APPA4-POSITIVEN SPHÄROIDE DER IF-PRÄPARATE .....	68
ABBILDUNG 32: QUANTITATIVE VERTEILUNG DER WERTE DER NEBENACHSE DER APPA4-POSITIVEN SPHÄROIDE IN DEN IF-PRÄPARATEN .....	69
ABBILDUNG 33: VOLUMEN DER APPA4-POSITIVEN SPHÄROIDE IN DEN IF-PRÄPARATEN PRO VERSUCHSTIER .....	71
ABBILDUNG 34: VOLUMEN DER SPHÄROIDE IN DEN EM-DATEN PRO TIER .....	72
ABBILDUNG 35: VERGLEICH DER MITTELWERTE DER VOLUMINA DER SPHÄROIDE IN DEN IF-PRÄPARATEN UND DEN EM-DATEN .....	73
ABBILDUNG 36: VERGLEICH DER VOLUMINA DER SPHÄROIDE IN DEN IF-PRÄPARATEN UND DEN EM-DATEN .....	74
ABBILDUNG 37: DIE NEBENACHSE SPHÄROIDE DER EM-DATEN .....	75
ABBILDUNG 38: VERGLEICH DER NEBENACHSE DER SPHÄROIDE IN DEN IF-PRÄPARATEN UND DEN EM-DATEN .....	76
ABBILDUNG 39: MITTELWERT DER NEBENACHSEN DER SPHÄROIDE DER IF- UND EM-DATEN, EINGETEILT IN DIE KLASSEN I-III ANHAND IHRER NEBENACHSEN .....	77
ABBILDUNG 40: MITTELWERT DER VOLUMINA DER SPHÄROIDE DER IF- UND EM-DATEN, EINGETEILT IN DIE KLASSEN I-III ANHAND IHRER NEBENACHSEN .....	79
ABBILDUNG 41: OVALE APPA4-POSITIVE SPHÄROIDE DER 3-WOCHEN-CUPRIZONE-VERSUCHSTIERE .....	81
ABBILDUNG 42: RUNDLICHE APPA4-POSITIVE SPHÄROIDE DER 3-WOCHEN-CUPRIZONE-VERSUCHSTIERE .....	82
ABBILDUNG 43: LÄNGLICHE APPA4-POSITIVE SPHÄROIDE .....	82
ABBILDUNG 44: TROPFENFÖRMIGE APPA4-POSITIVE SPHÄROIDE .....	83

ABBILDUNG 45: ZWEI DICT AUF EINANDER FOLGENDE, ZUSAMMENHÄNGENDE APPA4-POSITIVE SPHÄROIDE .....	83
ABBILDUNG 46: UNTERSCHIEDLICH STARKE APPA4-SIGNALE DER APPA4-POSITIVEN SPHÄROIDE DERSELBEN AUFNAHMESCHICHT .....	84
ABBILDUNG 47: OVALE SPHÄROIDE DER 3-WOCHEN-CUPRIZONE-VERSUCHSTIERE .....	85
ABBILDUNG 48: ANNÄHERND RUNDLICHE SPHÄROIDE DER 3-WOCHEN-CUPRIZONE-VERSUCHSTIERE .....	86
ABBILDUNG 49: LÄNGLICHE SPHÄROIDE DER 3-WOCHEN-CUPRIZONE-VERSUCHSTIERE MIT TEILWEISE OVOIDEN ENDEN .....	86
ABBILDUNG 50: ZWEI DICT AUF EINANDER FOLGENDE SPHÄROIDE DER 3-WOCHEN-CUPRIZONE-VERSUCHSTIERE .....	87
ABBILDUNG 51: MYELINISIERTE UND NICHT-MYELINISIERTE SPHÄROIDE DER 3-WOCHEN-CUPRIZONE-VERSUCHSTIERE .....	87
ABBILDUNG 52: VERSCHIEDENE FORMEN DER SPHÄROIDE IN RÄUMLICHER NÄHE ZUEINANDER AM BEISPIEL VON VERSUCHSTIER B4 .....	88
ABBILDUNG 53: DREIDIMENSIONALE REKONSTRUKTIONEN DER VERSUCHS- UND KONTROLLTIERE MIT BioVis3D .....	89
ABBILDUNG 54: ANZAHL DER DEGENERIERTEN AXONE PRO FLÄCHE PRO VERSUCHSTIER .....	90
ABBILDUNG 55: ANZAHL DER DEGENERIERTEN AXONE PRO FLÄCHE DER KONTROLLTIERE C1, C2, C3 UND C4. ....	91

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN .....	22
TABELLE 2: CHEMIKALIEN- UND MATERIALIEN FÜR DIE PERFUSION UND EINBETTUNG.....	24
TABELLE 3: HERSTELLUNG VON PARAFORMALDEHYD (1 LITER).....	27
TABELLE 4: HERSTELLEN VON 10%IGEN PHOSPHATPUFFER (PBS).....	27
TABELLE 5: HERSTELLUNG DER SUROSE-LÖSUNG .....	28
TABELLE 6:INKUBATIONSPROTOKOLL DER GEWEBE MIT DER SUCROSE-LÖSUNG.....	28
TABELLE 7: HERSTELLUNG DES AUFBEWAHRUNGSPUFFERS.....	31
TABELLE 8: CHEMIKALIEN- UND MATERIALIEN FÜR DIE FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ .....	32
TABELLE 9: HERSTELLUNG VON TRISEDTA-PUFFER (5L).....	34
TABELLE 10:HERSTELLUNG VON CITRAT- PUFFER (10L) .....	35
TABELLE 11: MODIFIZIERUNG DER OBJEKTTRÄGER.....	36
TABELLE 12: HERSTELLUNG DES PEROXIDASEBLOCKS(10ML) IN DER KONZENTRATION 1:50 .....	37
TABELLE 13:HERSTELLUNG DER PRIMÄRANTIKÖRPER-LÖSUNG.....	37
TABELLE 14: HERSTELLUNG DER SEKUNDÄRANTIKÖRPER- LÖSUNG .....	38
TABELLE 15:HERSTELLUNG DER DAPI-LÖSUNG IN DER KONZENTRATION 1:50 .....	38
TABELLE 16: ÜBERSICHT DER IF APPA4-FREE-FLOATING-FÄRBUNG .....	39
TABELLE 17: MATERIALIEN FÜR DIE AUSWERTUNG DER IF-DATEN .....	41
TABELLE 18: KAMERAEinstellung ZUM ANFERTIGEN DER IF-SCANS MIT .....	
STEREOINVESTIGATOR®.....	42
TABELLE 19: MATERIALIEN FÜR DIE AUSWERTUNG DER EM-DATEN.....	50
TABELLE 20: VERSUCHSGRUPPEN.....	51
TABELLE 21: Einteilung der Sphäroide in Klassen anhand des maximalen .....	
Durchmessers der kleineren Seite .....	59
TABELLE 22: VERGLEICH DER MITTELWERTE DER MAXIMALEN DURCHMESSER DER IF- UND DER .....	
EM-Sphäroide pro Klasse in $\mu\text{m}$ .....	78
TABELLE 23: VERGLEICH DER ANZAHL AN MAXIMALEN DURCHMESSER DER IF- UND DER EM- .....	
Sphäroide pro Klasse in Prozent .....	78
TABELLE 24: VERGLEICH DER MITTELWERTE DER VOLUMINA DER IF- UND DER EM-Sphäroide .....	
pro Klasse in $\mu\text{m}$ .....	79
TABELLE 25: VERGLEICH DER ANZAHL AN VOLUMINA DER IF- UND DER EM-Sphäroide pro .....	
Klasse in Prozent .....	80

## Abkürzungsverzeichnis

AK-EW	Alterskorrigierte Erkrankungswahrscheinlichkeiten
APPA4	$\beta$ -Amyloid Amyloid -Precursor-Protein A4
BSA	Bovines Serumalbumin
BZW	Beziehungsweise
CC	Corpus Callosum
CIS	Clinical isolated syndrome; dt. klinisch isoliertes Syndrom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DSU	engl. Disk-Spinning-Unit
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Dinatriumsalz Dihydrat
EM	Elektronenmikroskopie
IF	immunfluoreszenz
i.v.	Intravenös
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MOG	Myelin-Oligodentrozyten-Glykoprotein
MPB	engl. Myelin Basic Protein; dt. Myelinprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NGS	engl. Normal goat serum; dt. Blutserum der Ziege
PBS	Phosphatpuffer
PLP	Proteo-Lipid Protein
PPMS	Engl. Primary progressive multiple sclerosis; dt. Primär progrediente Multiple Sklerose

ROI	engl. Region of interest; dt. Bereich von Interesse
RRMS	engl. Relapsing-remitting multiple sclerosis; dt. Schubförmige Multiple Sklerose
SBF-SEM	engl. serial block-face scanning electron microscopy; dt. serielle Blockfeld-Rasterelektronen-mikroskopie
ZNS	Zentrales Nervensystem

# **1. Einleitung**

## **1.1 Die Multiple Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine der häufigsten chronisch-entzündlichen, neurodegenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) junger Erwachsener der westlichen Welt (Kipp et al. 2009b). Ihre Ätiologie ist bislang nur unzureichend geklärt und stellt daher einen wesentlichen Teil der Forschung zur MS dar (Wiendl and Kieseier 2010; Keegan; and Noseworthy 2002).

### **Geschichtliche Hintergründe der MS**

Die chronisch-entzündliche Erkrankung, die durch multifokale Demyelinisierungsprozesse des ZNS charakterisiert ist, wurde erstmals in den 1830er Jahren von Jean Cruveilhier (1793-1873) und von Calswell (1793-1857) beschrieben. Das erste klinisch umfassende Krankheitsbild stammte 1868 von Jean-Martin Charcot (Murray 2009).

### **Epidemiologie**

Weltweit sind heutzutage circa 2,5 Mio. Menschen an MS erkrankt, die größtenteils aus Europa, Nordamerika und Australien stammen (Schmidt and Hoffmann 2006). Hier liegt die durchschnittliche Inzidenz bei 2-5 pro 100.000 Einwohner (Mayr et al. 2003), in Deutschland bei 8 pro 100.000 (Grytten, Torkildsen, and Myhr 2015).

Es wurde ein geographischer Gradient mit abnehmender Prävalenz in der Äquatorialebene beobachtet (Schmidt and Hoffmann 2006). Die westliche Bevölkerung ist häufiger betroffen als Schwarzafrikaner oder Menschen orientalischer Herkunft (Schmidt and Hoffmann 2006).

Die MS tritt bei Frauen etwa zwei bis drei-mal so häufig auf wie bei Männern (Alonso and Hernan 2008; Kingwell et al. 2013), dabei erkranken die meisten Patienten im Alter von 20-40 Jahren (Schmidt and Hoffmann 2006).

### **Ätiologie**

Das histologische Merkmal der Krankheit ist die Kombination aus Oligodendrozytenverlust, Mikrogliose und Demyelinisierungen (Lassmann, Suchanek, and Ozawa 1994). Zu beobachten sind eine Immunzellrekrutierung, eine axonale Degeneration und eine daraus resultierende Atrophie der grauen und weißen Substanz (Fisher et al. 2008; Chard and Miller

2009). Makroskopisch zeigen sich diese Merkmale als Entzündungsherde, sogenannte Plaques, die in der weißen und der grauen Substanz zu finden sind (Kutzelnigg et al. 2005).

Es besteht der Konsens, dass der MS eine multifaktorielle Genese zugrunde liegt, die jedoch noch nicht entschlüsselt wurde.

Aufgrund der Rekrutierung autoreaktiver T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS entwickelte sich zunächst die Hypothese, die MS sei eine klassische Autoimmunerkrankung. In der T-Zellmigration wurde die Ursache von Demyelinisierungsherden in der weißen und grauen Substanz gesehen (Stys et al. 2012). Die Hypothese beruht aufgrund der T-Zell-Migration aus der Peripherie in das ZNS auf der sogenannten „Outside-In“-Theorie (Stys et al. 2012).

Dieser Annahme steht die „Inside-Out“-Theorie gegenüber. Sie stellt die MS als primär neurodegenerative Erkrankung dar. Diese Hypothese besagt, dass degenerative Prozesse des ZNS die Oligodendrozytenapoptose auslösen, die Myelindefizite und einen konsekutiven, axonalen Schaden zur Folge hat. Anschließend kommt es laut der „Inside-Out“-Hypothese zu einer Immunzellrekrutierung über die Blut-Hirn-Schranke (Nakahara et al. 2012).

Beide Theorien lassen sich mit dem klinischen und histologischen Bild der Erkrankung vereinbaren, da die MS eine sehr heterogene Pathophysiologie bezüglich der Erstmanifestation, der Progredienz, der Verlaufsform und der Symptome aufweist (Hunter 2016).

## **Pathomechanismen**

Luchinetti et. al ( 2000) unterscheiden auf histopathologischer Ebene vier MS Typen.

Typ I äußert sich durch aktivierte T-Zellen im ZNS. Diese vermindern die Anzahl der Proteine Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), basisches Myelin-Protein (MBP) und Proteolipid-Protein (PLP) in der Myelinscheide. Typ II zeigt ein ähnliches pathologisches Bild, jedoch mit einer Beteiligung des Komplementsystems sowie von Immunglobulinen (Lucchinetti et al. 2000). Damit entsprechen beide Typen der „Outside-In“-Hypothese und beschreiben eine primär autoimmune Pathogenese. Bei Typ III nach Luchinetti et al. wurde ein MAG-Verlust durch die Oligodendrozytenapoptose festgestellt und bei Typ IV eine hochgradige, atypische Oligodendrozytenapoptose. Typ III und IV entsprechen somit der „Inside-Out“-Theorie und besitzen eine primär neurodegenerative Pathogenese. Quantitativ beobachtet werden in abnehmender Reihenfolge Typ II > Typ III > Typ I > Typ IV (Lucchinetti et al. 2000).

Bei der Erstmanifestation sind häufig motorische Defizite wie Paresen, Sensibilitätsstörungen, Optikusneuritis und psychische Defizite sowie kognitive Störungen, Fatigue und Depressionen feststellbar. Frühzeitig können sich auch Symptome zeigen, die eher dem fortgeschrittenen Verlauf zugeschrieben werden, wie Spastiken, Ataxien und Schmerzsyndrome (Schmidt and Hoffmann 2006).

Meist treten die Symptome in Schüben auf. Ein Schub wird definiert als ein neu auftretendes Symptom oder eine Verschlechterung oder der Wiederkehr von bereits bekannten Symptomen über einen Zeitraum von über 24 Stunden nach einem symptomfreien Intervall von mindestens 30 Tagen ohne vorliegende Infektionen oder Änderungen der Körpertemperatur (Schulz 2010).

### **Diagnostik**

Die Diagnosestellung der MS erfolgt durch verschiedene Untersuchungsmethoden unter Ausschluss anderer inflammatorischer Erkrankungen des ZNS. Ersten Anzeichen einer MS-Erkrankung gehen einzelne neurologische Defizite umschriebener ZNS-Läsionen voran, die unter dem Begriff des „klinisch isolierten Syndroms“ (engl.: „clinical isolated syndrome“; CIS) zusammengefasst werden. Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie empfiehlt zur Diagnostik die im Jahre 2010 modifizierten McDonald-Kriterien der internationalen Expertengruppe „International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis“ (Gold 2012). Diese sehen Anamnese-abhängig eine Kombination aus einer klinisch-neurologischer Untersuchung, der Magnetresonanztomographie (MRT), der Aufzeichnung evozierter Potenziale und der Liquoruntersuchung vor, um zeitlich und räumlich disseminierte Entzündungsherde des ZNS nachweisen zu können (Polman et al. 2011). Der Schweregrad der Behinderung wird anhand einer Skala angegeben, der „Expanded Disability Status Scale“ (Kurtzke 1983).

### **Verlaufsformen**

Es lassen sich drei Verlaufsformen der MS differenzieren:

Die RRMS (engl. „Relapsing remitting multiple sclerosis“ = RRMS), die sich meist in einem mittleren Alter von 30 Jahren manifestiert (Miller, Chard, and Ciccarelli 2012) und sich durch klar abgrenzbare Schüben mit vollständiger oder anteiliger Remission in schubfreien Intervallen ohne Krankheitsprogression definiert (Lublin et al. 2014). Im Verlauf der RRMS

nehmen die Schübe an Quantität und Qualität zu und die schubfreien Intervalle ab. Die schubförmige Verlaufsform stellt mit 85 % aller Fälle die häufigste dar.

Die SPMS (engl.: „secondary progressive multiple sclerosis“ = SPMS) ist eine sekundär chronisch-progrediente Form. Etwa 30 bis 40 % der Patienten mit der Verlaufsform RRMS gehen nach 10 bis 15 Jahren durch diese Progredienz in die sekundär chronisch-progrediente Form SPMS über (Weinshenker et al. 1989; Kipp et al. 2009b); nach über 20 Jahren sind es bereits 90 % aller ursprünglich RRMS-Erkrankten (Schmidt and Hoffmann 2006). Die SPMS ist durch maßgeblich neurodegenerative Prozesse charakterisiert und nimmt damit einen deutlich progressiveren Verlauf mit oder ohne Schübe, geringfügigerer Remission und dadurch anhaltender oder sich stetig verschlechternder Symptomatik (Lublin et al. 2014).

Die dritte Form, die unterschieden wird, ist die in 10-20 % der Fälle auftretende primär chronisch-progredienten Form (engl.: „primary progressive multiple sclerosis“ = PPSM) (Miller, Chard, and Ciccarelli 2012). Auch diese Form definiert sich aufgrund dominierender Neurodegeneration durch eine progrediente Verschlechterung von Beginn an mit nur wenigen und geringfügigen Remissionen. Klassische Schübe treten hierbei nur sehr selten auf (Lublin et al. 2014).

## **Therapie**

Bislang existieren nur Therapieformen, die der Immunmodulation dienen und keinen Einfluss auf die Neurodegeneration haben. Es existiert keine kurative Therapie (Kip, Schönfelder, and Bleß 2016).

Therapeutisch wird zwischen der akuten, schubbezogenen und einer dauerhaften immunmodulierenden Therapie unterschieden (Schmidt and Hoffmann 2006). Die Leitlinie der DGN sieht eine Stufentherapie vor, die die Spektren beider Therapieformen vereint (siehe Abbildung 1). Während des akuten Schubes wird dieser zufolge mehrtägig Methylprednisolon intravenös verabreicht oder die Plasmaphrese angewendet. Die Dauertherapie sieht als Basismaßnahme eine Interferon- $\beta$ - oder Glatirameracetat-Gabe zur Immunmodulation vor. Bei (hoch)aktiven Verlaufsformen wird eine Eskalationstherapie mit monoklonalen Antikörpern (Natalizumab), Antibiotika, (Mitoxantron), Zytostatika (Cyclophosphomid) oder Immunsuppressiva (Fingolimod) durchgeführt.

	CIS	RRMS	SPMS	PPSM
Eskalations- therapie <sup>1</sup>	—	<b>1. Wahl:</b> ➤ Fingolimod ➤ Natalizumab  <b>2. Wahl:</b> ➤ Mitoxantron ➤ Cyclophosphamid <sup>4</sup>	—	—
Basistherapie	➤ Glatirameracetat ➤ Interferon-β1a i.m. ➤ Interferon-β1a s.c. ➤ Interferon-β1b s.c.	➤ Glatirameracetat ➤ Interferon-β1a i.m. ➤ Interferon-β1a s.c. ➤ Interferon-β1b s.c. ➤ (Azathioprin) <sup>2</sup> ➤ (IVIg) <sup>3</sup>	<b>1. Mit Schüben</b> ➤ Interferon-β1a s.c. ➤ Interferon-β1b s.c. ➤ Mitoxantron ➤ Cyclophosphamid <sup>5</sup>  <b>1. Ohne Schübe</b> ➤ Mitoxantron ➤ Cyclophosphamid <sup>5</sup>	➤ Glatirameracetat ➤ Interferon-β1a i.m. ➤ Interferon-β1a s.c. ➤ Interferon-β1b s.c. ➤ (Azathioprin) <sup>2</sup> ➤ (IVIg) <sup>3</sup>
Schubtherapie	<b>1. Wahl:</b> ➤ Methylprednisolonpuls <b>1. Wahl:</b> ➤ Plasmaseparation	<b>1. Wahl:</b> ➤ Methylprednisolonpuls <b>1. Wahl:</b> ➤ Plasmaseparation	<b>1. Wahl:</b> ➤ Methylprednisolonpuls <b>1. Wahl:</b> ➤ Plasmaseparation	—

**Abbildung 1: Immunmodulatorische Stufentherapie der MS** (modifiziert nach DGN- und KKNMS-Leitlinien, Stand: August 2014; [www.dgn.org/leitlinien/2333-II-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose](http://www.dgn.org/leitlinien/2333-II-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose))

<sup>1</sup>Eskalationstherapie des Schubes: Bei therapierefraktärer Schubsymptomatik nach der i.v. GKS-Pulstherapie kann die Initialtherapie über die übliche Dauer von 3-5 Tagen bis zu maximal 10 Tagen ggf. mit einer höher dosierten Applikation gegenüber der Standarddosierung (500-1000 mg MP) fortgesetzt werden.

<sup>2</sup>Zugelassen, wenn IFN-β nicht möglich ist oder unter Azathiopin-Therapie ein stabiler Verlauf erreicht wird

<sup>3</sup>Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen

<sup>4</sup>Zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen

Zusätzlich zu diesen therapeutischen Maßnahmen werden Begleitsymptome behandelt (Schulz 2010).

## Prognose

Aufgrund der hohen Heterogenität des Krankheitsverlaufes ist es äußerst schwierig, valide Prognosen über die Pathophysiologie der Patienten zu stellen. Studien ergaben, dass die Wahrscheinlichkeit einer langfristigen Behinderung sinkt, je früher mit der Therapie begonnen wurde (Kip, Schönfelder, and Bleß 2016) und je jünger die Patienten bei der Erstmanifestation sind (Tremlett et al. 2009). Die Prognose für eine Erkrankung an der SPMS ist aufgrund der therapieresistenten Neurodegeneration wesentlich schlechter als bei der RRMS. 50 % der Erkrankten benötigen nach 15-28 Jahren eine Gehhilfe; die Lebenserwartung ist um 6-10 Jahre reduziert (Schmidt and Hoffmann 2006).

## **Forschungsschwerpunkte**

Schwerpunkt experimenteller Forschung der MS bilden menschliche Proben in Form von Autopsie-Material, Biopsien und Liquorentnahmen sowie Tiermodelle. Tiermodelle sind experimentelle Studienmodelle, bei denen anhand von Tierversuchen neue medizinische Methoden analysiert und auf den menschlichen Organismus übertragen werden. Aufgrund der Reproduzierbarkeit haben sich zahlreiche Tiermodelle etabliert, die der Grundlagenforschung dienen, obgleich die MS eine rein humanpathogene Erkrankung darstellt (Torkildsen et al. 2008).

Das meist genutzte Tiermodell stellt die „experimentelle autoimmune Encephalomyelitis“ (engl.: „experimental allergic encephalomyelitis“ = EAE) dar (Kipp et al. 2009b; Torkildsen et al. 2008). Dieses Modell induziert durch die Injektion von Bestandteile der Myelinproteine MAG, PLP und MOG eine akute, chronisch-schubhafte autoimmune Entzündungsreaktion, die konsekutive Demyelinisierungen hervorruft und damit dem Typ I und II nach Lucchinetti et al. entspricht (Kipp et al. 2009a).

Ein weiteres Modell, die Theilervirus-Enzephalomyelitis, löst Virus-basierte Demyelinisierungsherde aus (Oleszak et al. 2004; van der Star et al. 2012). Auch dieses Modell entspricht damit den Typen I und II nach Luchinetti et al. Beide Modelle basieren auf der „Outside-in“-Hypothese.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Tiermodell, das Cuprizone-Modell, gehört den toxischen Demyelinisierungsmodellen an. Zu diesen gehören außerdem Modelle, die Demyelinisierungen durch Lysolecithin- oder Ethidiumbormid-Injektionen hervorrufen. Ihre neurodegenerative Pathogenese ist vergleichbar mit den von Lucchinetti et al. definierten Typen III und IV und unterstützt damit die „Inside-Out“-Hypothese (Torkildsen et al. 2008).

Im Folgenden wird das Cuprizone-Modell genauer erläutert.

### **1.2 Das Cuprizone-Modell**

Das Cuprizone-Modell sieht die regelmäßige Verabreichung von 0,2 %iger Cuprizone (Bisoxaldihydraton) vor, um eine Neurodegeneration in Form einer Oligodendrozytenapoptose auszulösen, die in zentralen Entmarkungsherden, sogenannten Demyelinisierungsplaques, resultiert. Diese Plaques sind bereits nach einer dreiwöchigen Cuprizoneintoxikation histologisch nachweisbar und erreichen ihr Maximum nach fünf

Wochen. In diesem Stadium wird von einer „akuten Demyelinisierung“ gesprochen (Kipp et al. 2009b). Bereits nach einer Woche Cuprizoneverabreichung konnte eine verminderte Genexpression oligozytärer Proteine festgestellt werden, die sich nach drei Wochen um 90 % reduzierte. Dies stellt den Beginn neurodegenerativer Demyelinisierungsprozesse dar (Morell et al. 1998).

Während der akuten Demyelinisierung kann binnen vier Tagen eine Remyelinisierung erfolgen, wie sie auch zu Beginn der MS möglich ist. Mit dem Cuprizone-Modell lassen sich daher De- und Remyelinisierungsmechanismen untersuchen. In einem chronischen Stadium der Demyelinisierung kann die Regeneration aufgrund einer gestörten Oligodendrozytenregeneration ausbleiben (Lindner et al. 2008). Von einer chronischen Demyelinisierung spricht man ab einer Cuprizoneexposition von über zwölf Wochen (Armstrong et al. 2006). Zusätzlich kommt es nach Cuprizoneintoxikation zu einer Mikrogliose und axonalen Schäden, wie sie auch in MS-Läsionen bekannt sind (Torkildsen et al. 2008).

Der genaue Pathomechanismus des Cuprizone-Modells ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Es besteht die Annahme, dass Cuprizone als Kupfer-Chelator kupferabhängige, mitochondriale Enzyme, wie das Cytochrom C und die Monoaminoxidase, inhibiert und die folgenden, metabolischen Defizite in einer Oligodendrozytenapoptose resultieren (Matsushima and Morell 2001). Dies entspräche einem primär neurodegenerativen Prozess. Das Cuprizone-Modell ist T-Zell-unabhängig (Matsushima and Morell 2001). Dies könnte durch die intakt bleibende Blut-Hirn-Schranke begründet sein, die bei der EAE beschädigt wird (McMahon, Suzuki, and Matsushima 2002). Die Unabhängigkeit von T-Zellen suggeriert, dass die Demyelinisierung und der axonale Schaden im Cuprizone-Modell nicht autoimmuner, sondern neurodegenerativer Natur sind.

Zum aktuellen Stand ist nicht hinreichend geklärt, ob der MS primär eine autoimmune oder neurodegenerative Ätiologie zu Grunde liegt. Durch die Heterogenität der Pathophysiologie wurden beide Formen als primäre Ursache beschrieben. Es bleibt daher unabdingbar, nicht nur immunologische, sondern auch neurodegenerative Tiermodelle wie das Cuprizone-Modelle zu untersuchen.

Die zwei am häufigsten verschriebenen immunmodulierenden Medikamente der MS-Therapie,  $\beta$ -Interferon und Glatirameracetat, zeigen keine Wirkung auf die progressiven Formen der MS (Panitch et al. 2004). Zum aktuellen Stand gibt es nur immunsuppressive Medikamente, aber keine neuroregenerativen Ansätze bei der MS. Neurodegenerative Prozesse werden jedoch als Hauptursache der voranschreitenden Behinderung gesehen (Kipp et al. 2017).

### 1.3 Der axonale Schaden bei der MS

Die Neurodegeneration äußert sich sowohl durch geschädigte Synapsen und Neuronen als auch durch axonale Schäden (Kipp et al. 2017).

Im Tiermodell wird bei einer Axonschädigung zwischen dem akuten und dem chronischen Stadium differenziert, abhängig von der Dauer der Toxin-Exposition (Torkildsen et al. 2008).

Der akute axonale Schaden resultiert, so wird vermutet, aus einem gestörten antero-axonalen Transport von Vesikeln, Mitochondrien und Proteinen über das Motorprotein Kinesin entlang des Zytoskeletts (van den Berg, Hoogenraad, and Hintzen 2017). Der unphysiologische Transport entsteht durch Demyelinisierungen, die einen erhöhten ATP-Verbrauch initiieren. Ist das Transportsystem zu stark inhibiert, akkumulieren Zellorganellen und -proteine entlang des Axons (van den Berg, Hoogenraad, and Hintzen 2017). Die Axone schwellen aufgrund der Akkumulationen zu sogenannten Sphäroiden an, die sich elektronenmikroskopisch abbilden lassen (Trapp et al. 1998); Saxena and Caroni 2007). Immunhistochemisch besteht die Möglichkeit, die Sphäroide mithilfe spezifischer Marker, wie etwa dem integralen Membranprotein  $\beta$ -Amyloid-Precursor-Protein-A4 (APPA4), zu visualisieren (Torkildsen et al. 2008). APPA4 wird in den Zellkörpern der Neurone physiologisch synthetisiert und dann entlang der Axone zu den Synapsen transportiert. Bei einem defizitären Transportsystem akkumuliert das Protein gemeinsam mit Zellorganellen in den sich ausbildenden Sphäroiden und lässt sich daher mittels der Immunhistochemie detektieren. Da das APP in intakten Axonen auf diese Weise nicht zu detektieren ist, lassen sich mit dieser Methodik gezielt pathologische APP-Akkumulationen nachweisen. Untersuchungen nach letalen Kopfverletzungen zeigten zwei Stunden nach der Verletzung APP-Akkumulationen, die 10 bis 14 Tage messbar blieben (Gentleman et al. 1993; Geddes et al. 1997). Andere Studien konnten APP-Sphäroide über 30 Tage lang beobachten (Li et al. 1995; Pierce et al. 1996; Bramlett et al. 1997). Anschließend ließ sich das Glykoprotein nicht mehr nachweisen, weshalb es vor allem als Marker des akuten, axonalen Schadens anzusehen ist (Ferguson et al. 1997).

Trapp et al. zeigten anhand konfokaler Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen von aktiven Läsionen drei nebeneinander existierende Stadien des axonalen Schadens:

1. Normal erscheinende Axone
2. Axone mit diversen Demyelinisierungsherden
3. Durchtrennte Axone, die an ihrem distalen Ende rundliche, nichtmyelinisierte Verdickungen ausbildeten, sogenannte Bulbs (engl.: Knolle)

Letztere bildeten die Bulbs aufgrund eines anhaltenden Molekül- und Organellen-Transportes aus. Außerdem beschrieb Trapp, dass diese Sphäroide sich schließlich wieder zurückbildeten und somit Ausdruck des akuten, axonalen Schadens sind (Trapp et al. 1998).

Auch Nikic et al. definierten drei charakteristische Stadien des axonalen Schadens anhand einer in-vivo-imaging Studie (Nikic et al. 2011):

- Stadium 0: normal erscheinende Axone
- Stadium 1: fokale Schwellungen
- Stadium 2: Fragmentierungen

Zusätzlich kann durch den gestörten Transport von Mitochondrien weniger ATP transportiert werden. Aufgrund des hohen Energiebedarfs bei gleichzeitig geringen Energiereserven des ZNS in Form von ATP sind die Neuronen sehr anfällig für einen ATP-Mangel. Durch den ATP-Mangel werden die Calcium- und Natriumkanäle inhibiert, sodass der Calciumspiegel innerhalb des Axoplasmas toxische Werte annehmen kann. Somit führt schließlich der gestörte antero-axonale Transport zu neurodegenerativen Prozessen des Axons (van den Berg, Hoogenraad, and Hintzen 2017). Zahlreiche Analysen zeigen, dass Transportdefizite bereits vor einer erkennbaren Demyelinisierung oder größeren Veränderungen der Mikrotubuli vorhanden sind und somit ein frühes Merkmal des axonalen Schadens darstellen (Sorbara et al. 2014). Der kompromittierte, axonale Transport kann schließlich in einer Durchtrennung des Transportes resultieren. Das distale Ende des Axons ist somit nicht mehr versorgt, fragmentiert und degeneriert in der Folge.

Transportdefizite innerhalb der Axone konnten nicht nur in morphologisch veränderten Axonen, sondern bereits in normal erscheinenden aufgefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass Transportdefizite bereits ein sehr frühes Stadium des axonalen Schadens repräsentieren (Sorbara et al. 2014).

## 1.4 Technik der dreidimensionalen Analyse des akuten, axonalen Schadens

Axonale Transportdefizite sind sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch darstellbar.

Bei beiden Verfahren lassen sich dreidimensionale Rekonstruktionen axonaler Strukturen zur genaueren Analyse der Transportdefizite erstellen.

Lichtmikroskopisch lässt sich dies durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie anhand eines Disk-Unit-Mikroskops (DSU-Mikroskop) realisieren, während elektronenmikroskopisch die SBF-SEM Anwendung finden.

Bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie werden immunfluoreszierende Untersuchungen mit Fluorochromen auf der Grundlage standardisierter immunhistochemischer Färbungen durchgeführt.

Bei immunhistochemischen Färbungen handelt sich um die Färbung spezifischer Proteine durch Farbstoff-gekoppelte Antikörper, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion eingehen. Die Färbungen können direkt mit einem spezifischen Primärantikörper oder indirekt mit einem an den Primärantikörper bindenden Sekundärantikörper durchgeführt werden. Monoklonale Antikörper werden von polyklonalen Antikörpern unterschieden. Monoklonale Immunglobuline entstammen einem einzigen B-Lymphozyten und binden spezifisch an einen einzigen Epitop des Antigens. Polyklonale Antikörper richten sich hingegen gegen diverse Epitope, da sie von verschiedenen B-Lymphozyten synthetisiert werden.

Bei Immunfluoreszenzfärbungen (IF-Färbungen) werden Fluorochrome als Marker an den Sekundärantikörper gekoppelt. Durch Licht entsprechender Wellenlänge können die im Präparat gebundenen Fluorochrome angeregt und die Zielstrukturen visualisiert werden. Hierfür stehen spezielle Fluoreszenzmikroskope mit spezifischen Wellenlängeneinstellungen zur Fluoreszenz-anregung zur Verfügung.

Im Zuge der Anti-APP4-Immunfluoreszenzfärbung bindet der monoklonale Primärantikörper Anti-APP4 an das Glykoprotein APP4. APP4 ist ein Amyloid-Vorläufer Membran-Glykoprotein, das im Soma der Neurone synthetisiert und durch antero-axonalen Transport zu den Axonen befördert wird (van den Berg, Hoogenraad, and Hintzen 2017; Chitnis et al. 2016; Kuhlmann et al. 2002). Liegt ein akuter axonaler Schaden vor, bindet das Anti-APP4 kovalent an die Proteine der Membran akkumulierter Zellorganellen innerhalb der Sphäroide. Diese akkumulierten Zellorganellen stellen in ihrer Gesamtheit axonale Auftreibungen unterschiedlichster Form dar, die in der vollendeten Immunfluoreszenzfärbung als APP4-

positive Auftreibungen (sogenannte APPA4-positive Sphäroide) zu erkennen sind (Bitsch et al. 2000; Ferguson et al. 1997; Povlishock 1992).

Anti-APPA4 stellt daher einen sensitiven Marker für den gestörten antero-axonalen Transport dar (Povlishock 1992). Der verwendete Sekundärantikörper Donkey-Anti-Mouse beinhaltet das Fluorochrom Alexa Fluor 594 und bindet bei anschließender Verwendung an den Primärantikörper. Der Sekundärantikörper ist ein polyklonaler Antikörper. Bei erfolgreicher Färbung wird von den Präparaten bei einer Wellenlänge von  $\lambda=594\text{nm}$  rotes Licht emittiert, ausgehend von den APPA4-Akkumulationen.

Dies lässt sich anhand eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops mit Spinning-Disk, einer Scheibe mit mehreren spiralförmig angeordneten Lochblenden, visualisieren. Die Schichtdicke der konfokalen Scans ermöglicht eine dreidimensionale Betrachtung der Präparate, die mithilfe von Auswertungsprogrammen räumliche Analysen zulassen.

Elektromikroskopisch lassen sich dreidimensionale Analysen mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (engl.: „Transmission electron microscopy“, TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (engl.: „scanning electron microscopy“, SEM) erstellen.

Die TEM war hierbei die erste Technik für ultrastrukturelle Analysen, die durch Kombinationen verschiedener Verfahren dreidimensionale Rekonstruktionen zuließ (Crowther et al. 1970; Hoppe and Grill 1977; Frank 1995). Jedoch sind mit der TEM auch technische Nachteile verbunden. Die Bildgebung ist sehr zeitintensiv, erfordert sehr gute Mikrotom-Kenntnisse und resultiert oft im Verlust einzelner Sequenzen (Cocks et al. 2018). Einige Techniken können diese Limitierungen mithilfe von fortgeschrittenem Equipment überwinden, so etwa die Rasterelektronenmikroskopie in Form von serieller - Rasterelektronenmikroskopie (engl.: „serial block-face scanning electron microscopy“, SBF-SEM) (Miranda et al. 2015).

Das Rasterelektronenmikroskop bündelt einen Elektronenstrahl auf das Objekt und nutzt die Wechselwirkungen der Elektronen zur Generierung eines Bildes des Präparats.

Bei der SBF-SEM befindet sich in einer Vakuumkammer des Mikroskops ein Ultramikrotom, das vor jedem neuen Scan einen nanometerdünnen Schnitt der Kopffläche des Präparates anfertigt (Cocks et al. 2018).

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war der dreidimensionale Vergleich von Rekonstruktionen des akuten, axonalen Schadens im Cuprizone-Modell zur Untersuchung neurodegenerativer Prozesse der MS.

Der axonale Schaden ist mikroskopisch in Form von Auftreibungen entlang der Axone unterschiedlicher, räumlicher Struktur, sogenannten Sphäroiden, zu erkennen. Diese entstehen aufgrund axonaler Transportdefizite.

Die Analyse des akuten, axonalen Schadens soll Aufschluss über die der MS zugrunde liegende Ätiologie ergeben. Momentan existieren zwei Hypothesen bezüglich der Ätiologie: Die Outside-In-Hypothese und die Inside-Out-Hypothese. Es gilt zu klären, welche der Hypothesen der MS zugrunde liegt, um die Ätiologie der MS nachvollziehen zu können und daraus konkrete Maßnahmen der Therapie abzuleiten.

Aus dem gewonnenen Gewebe wurden zwei dreidimensionale Datensätze erstellt und die darin detektierten Sphäroide miteinander verglichen. Unser erster Datensatz wurde anhand immunfluoreszierender APPA4-Färbungen von Kryo-Schnitten angefertigt, die mithilfe eines konfokalen DSU-Fluoreszenzmikroskops eingescannt wurden. Der zweite Datensatz wurde durch ein biotechnisches Forschungsunternehmen mithilfe von SBF-SEM aus Kryo-Blöcken erstellt. Anschließend erfolgten die dreidimensionale Rekonstruktion der sphäroidalen Volumina mithilfe von Berechnungsprogrammen und der anschließende Vergleich der Rekonstruktionen beider Datensätze.

Die Arbeitshypothese lautete:

„Der akute, axonale Schaden im Cuprizone-Modell zeigt in dreidimensional rekonstruierten Sphäroiden vergleichbare Merkmale in immunfluoreszierenden und elektronenmikroskopischen Daten“.

Die Arbeit konzentriert sich speziell auf folgende Aspekte des akuten, axonalen Schadens:

1. Der Vergleich der Volumina der Sphäroide
2. Die deskriptive Analyse der Formen der Sphäroide
3. Die Anzahl degenerierter Axone pro Untersuchungsfläche

All diese Aspekte dienen der weiteren Entschlüsselung der Ätiologie und Pathogenese der MS, um die Grundlage weiterer Therapiemöglichkeiten zu schaffen.

### 3. Material & Methoden

#### 3.1 Erstellung der immunfluoreszierenden (IF) Daten

##### 3.1.1 Versuchsaufbau

Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über die verwendeten Materialien und Chemikalien, die für den Versuch benötigt wurden.

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Materialien**

<b>Material/ Chemikalien</b>	<b>Genauere Bezeichnung</b>	<b>Firma (Name, Stadt, Land)</b>	<b>Bestellnummer</b>
Bechergläser	1000ml	VWR, Darmstadt, Deutschland	213-1111
Cuprizone	Bis-Cyclohexanone oxaldihydrazone	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	C9012
Einstreu	bedding PS 14 select	ssniff Soest, Deutschland	H1505-30
Falcon-Röhrchen	Rotilabo®- Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit Beschriftungsfeld	Roth, Karlsruhe, Deutschland	N463.1
Haltungsfutter	Ratte/Maus-Haltung, 10mm, autoklavierbar	ssniff, Soest, Deutschland	V1534-300
Maushäuschen	Mäuse Iglu Rot	Plexx BV, Elst, Niederlande	13100
Mehl, SM R/M (Pulverfutter)	Kontrolle ohne Substanz, SM Ratte/Maus,	ssniff, Soest, Deutschland	V1530-00

	Control/Placebo		
Mixer	Kult X	WFM	
Nest	Nestlets	Plexx BV, Elst,Niederlande	14010
Petrischalen	Petrischalen, Standardausführung,  Steril (gamma-sterilisiert) ohne Belüftungsnocken, ø 94mm, H16mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland	EN16.1
Versuchskäfig	BlueLine, TypII long,  Material Polysulfon	Techniplast	1284L00SUV
Waageschale	46x46x8	VWR, Darmstadt, Deutschland	611-9178

Die Versuchsgruppe bestand aus neun männlichen Mäusen (C57BL/6, Janvier, Frankreich); die Kontrollgruppe aus fünf männlichen Mäusen (C57BL/6, Janvier, Frankreich). Die Käfigausstattung beider Gruppen bestand aus handelsüblichem Kleintierstreu, einer Trinkflasche mit Leitungswasser, Futter, einem Häuschen und Nestlet-Einlagen (siehe Tabelle 1). Alle zwei Tage fand ein Käfigwechsel statt. In der Tierhaltung des Physiologikums (Pettenkoferstraße 11, 80336 München) wurde das Licht täglich um 6.00 Uhr morgens eingeschaltet und abends um 19.00 Uhr ausgeschaltet, um einen zirkadianen Rhythmus einzuhalten. Die Raumtemperatur betrug zwischen 20° und 24° C; die Luftfeuchtigkeit zwischen 40 % und 60 %.

Bis zu Beginn des Versuches bekamen alle Tiere handelsübliches Haltungsfutter in Form von Pellets. Die Mäuse wurden bis zum Beginn des Versuches täglich gewogen, bis sie das Zielgewicht von mindestens 20 g aufwiesen.

Die Tierversuche wurden gemäß der internationalen Tierschutzbestimmungen § 8 durchgeführt und von der Ethikkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt.

(Tierversuchsgenehmigung: 55.2-1-54-2532-73-15). Durchgeführt wurde der Versuch von den Mitarbeitern und Doktoranden des Lehrstuhls für Neuroanatomie (Lehrstuhl II) der LMU München und des Institutes für Neuroanatomie der Uniklinik RWTH Aachen.

Bei Erreichen des Mindestgewichts von 20 g wurden die Versuchstiere drei Wochen mit 0,25 % Cuprizone versetztem Futter gefüttert, während die Kontrollgruppe weiterhin handelsübliches Futter in Form von Pellets erhielt. Das Cuprizone wurde täglich frisch mit einem Küchenmixer unter das Haltungsfutter vermengt. Pro Käfig wurde dabei 100 g gemahlene Haltungsfutter vermengt mit 0,25 g Cuprizone-Pulver auf die Käfige der Versuchstiere verteilt. Täglich wurde eine Beurteilung des Gesundheitszustandes jedes Tieres vorgenommen und dokumentiert.

### 3.1.2 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden drei Wochen nach Start der Cuprizone-Gabe transkardial perfundiert. Die hierzu benötigten Chemikalien und Materialien sind in Tabelle 2 gelistet.

**Tabelle 2: Chemikalien- und Materialien für die Perfusion und Einbettung**

Chemikalie	Genaue Bezeichnung	Firma (Name, Stadt, Land)	Bestellnummer
1Triton-X-100	$C_8H_{17}C_6H_4(OCH_2CH_2)_nOH$	Merck	1.08603.1000
B.Braun Omnifix® Luer	50 ml	Braun, Mainz, Deutschland	22050
B.Braun Omnifix® Luer	Spritze 20 ml	Braun, Mainz, Deutschland	4616200F
Bechergläser	1000 ml	VWR, Darmstadt, Deutschland	213-1111
Dinatriumhydrogenphosphat	$Na_2HPO_4$	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.06580.1000
EDTA	Dinatriumsalz Dihydrat	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim,	03685

		Deutschland	
Falcon-Röhrchen	Rotilabo®- Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit Beschriftungsfeld	Roth, Karlsruhe, Deutschland	N463.1
Filterpapier	Ø 240 mm	Schleicher & Schuell, Düren, Deutschland	594 1/2
Formaldehyd	37 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	CP10.2
Gelatine gepulvert		Merk, Darmstadt, Deutschland	4078.0500 631-0108
Glycerol 99 %		Merk, Darmstadt, Deutschland	1370289010
Isopentan		VWR, Darmstadt, Deutschland	24872.298
Kreisschüttler		VWR	444-9213
Kryostat	CM1950	Leica	
<b>Material/Chemikalien</b>	<b>Genaue Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestell- nummer</b>
Multiwell-Zellkulturplatte 24-Well-Platte	Flacher Boden, unbehandelt	VWR, Darmstadt, Deutschland	734-2779
Nadeln	27Gx 3/4; 0,4x20 mm	Terumo, Eschborn, Deutschland	NN-2719R
Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.06346.100 0

Natronlauge	NaOH 1 mol/l	Roth, Karlsruhe, Deutschland	K021.1
OP-Besteck	Atraumatische Pinzette, 105mm	VWR, Darmstadt, Deutschland	232-0086
	Atraumatische Pinzette, 300mm	VWR, Darmstadt, Deutschland	232-0093
	Laborschere, 130 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland	233-1221
Original-Perfusor® Line	150 cm, PVC-frei	Braun, Mainz, Deutschland	8722935
PBS Dulbecco	PBS-Pulver ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Merck (Biochrom), Darmstadt, Deutschland	L-182-50
Safety-Multifly-Kanüle	20G 200 mm lang	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	85.1637.235
Schottflaschen	1000 ml, Enghalsflasche mit Schraubverschluss	VWR, Darmstadt, Deutschland	215-1557
Schottflaschen	2000 ml	VWR, Darmstadt, Deutschland	215-1558
Spritze	1 ml	Henke- Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland	
Sucrose	pH 7 (100 g/l, H <sub>2</sub> O, 20 °C)	Merck	1.07687
TissueTech®		Sakura Finetek	4583
Trichter	Ø 250 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland	221-1730

Die Perfusion der Versuchstiere fand drei Wochen nach Beginn der Cuprizone-Intoxikation statt. Die Kontrolltiere wurden nach fünf Wochen perfundiert, sodass sich diese auch zur

Kontrolle eines fünfwöchigen Cuprizone-Versuches eigneten. Die transkardiale Perfusion ermöglichte eine sehr gute Gewebefixierung, die der späteren morphologischen Untersuchung diene. Die Lösungen zur Perfusion wurden kurz vor der Durchführung aus den Substanzen der Tabelle 3 und 4 frisch angesetzt. Die Paraformaldehydlösung wurde anschließend gefiltert und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Sie wurde bis zur Verwendung mit Eis gekühlt.

**Tabelle 3: Herstellung von Paraformaldehyd (1 l)**

Substanz	Menge
Destilliertes Wasser	900 ml
Formaldehyd 37 %	100 ml
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	8 g
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	4,6 g

**Tabelle 4: Herstellung von 10%igen Phosphatpuffer (PBS)**

Angefertigte Lösung	Substanz	Menge
Stocklösung (5 Liter)	PBS Dulbecco Pulver	500 ml
	Destilliertes Wasser	4500 ml
Gebrauchslösung (5 Liter)	Stocklösung	500 ml
	Destilliertes Wasser	4500 ml

Die Kontroll- und Versuchstiere wurden zur Perfusion bei Raumtemperatur durch eine intraperitoneale Injektion eingeschläfert. Sobald motorische Defizite der Hinterfüße auftraten und die Mäuse eine verlangsamte Atmung aufwiesen, wurde die benötigte Anästhesietiefe über ausbleibende Hirnstammreflexe sichergestellt. Hierzu gehörten der Korneal-, Schmerz- und Schutzreflex, die bei Bewusstsein unter Berührung der Vibrissen einsetzen. Bei Ausbleiben dieser wurden die Tiere in Rückenlage fixiert. Der Thorax wurde sagittal mittels OP-Schere eröffnet. Der linke Ventrikel wurde mit einer Multifly®-Kanüle punktiert und das rechte Herzhorn eingeschnitten, um während der Perfusion eine Abflussmöglichkeit des Blutes im Körperkreislauf zu gewährleisten.

Es folgte die kontinuierliche transkardiale Perfusion über die Multifly®-Kanüle und den daran angeschlossenen Polyetherschlauch in den linken Ventrikel mit 20 ml PBS und anschließend mit zweimal 50 ml eiskaltem 4 % Paraformaldehyd zur gleichmäßigen Gewebefixation. Die ausreichende Fixierung wurde anhand der einsetzenden Kontraktion des Schwanzes der Maus kontrolliert. Anschließend wurde der Kopf des Tieres abgetrennt, die Schädelkalotte sagittal eröffnet und über 24 Stunden bei 4° C mit 4 % Paraformaldehyd postfixiert.

Für die Kryoprotektion wurden die Gehirne von der Schädelbasis und dem Rhinobulbus gelöst und aus der Schädelkalotte präpariert. Die Gehirne wurden über Nacht in PBS-Gebrauchslösung gespült. Anschließend wurden sie bei 4° C in zunächst 10%ige, dann 20%- und 30%ige Sucrose-Lösungen (Tabelle 5) gegeben. Pro Lösung wurden sie jeweils 9 Stunden und darauffolgend 15 Stunden inkubiert (Tabelle 6). Dieser Vorgang diente der Vermeidung der Kristallbildung innerhalb des Gewebes, die zu irreversibler Schädigung führen würde.

**Tabelle 5: Herstellung der Sucrose-Lösung**

Verwendete Lösung	Substanzen	Menge
1. PBS	s.o.	
2. 10 % Sucrose	- Sucrose - PBS	- 30 g - auf 100 ml auffüllen
3. 20 % Sucrose	- Sucrose - PBS	- 20 g - auf 100 ml auffüllen
4. 30 % Sucrose	- Sucrose - PBS	- 30 g - auf 100 ml auffüllen

**Tabelle 6: Inkubationsprotokoll der Gewebe mit der Sucrose-Lösung**

Verwendete Lösung	Inkubationsdauer	Spezielle Bedingungen
1. PBS	Eine Stunde	Raumtemperatur
2. PBS	Über Nacht (mindestens acht)	Raumtemperatur

	Stunden)	
3. PBS	Eine Stunde	Raumtemperatur
4. 10%ige Sucrose-Lösung	neun Stunden → Medienwechsel 5 Stunden	Bei 4° C
5. 20%ige Sucrose-Lösung	Neun Stunden → Medienwechsel 15 Stunden	Bei 4° C
6. 30%ige Sucrose-Lösung	Neun Stunden → Medienwechsel 15 Stunden	Bei 4° C

Nach der Inkubation wurden die Gehirne tiefgefroren. Um ein ausreichendes Durchfrieren der Gehirne sicherstellen zu können, wurden sie bei -75° C für 90 Sekunden in Isopentan und schließlich für 60 Sekunden auf Trockeneis gelagert.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Gehirne bei -20° C luftdicht verschlossen aufbewahrt.

### **Anfertigen der Kryoschnitte**

Bei -20° C Arbeitstemperatur wurden die Gehirne an dem Kryostaten (Leica CM1950) geschnitten. Die Gehirne wurden für den Schneidevorgang mithilfe des Gefrierschutzzeineinbettungsmediums Tissue Tech® senkrecht auf die plane Fläche des Objektträgers aufgefroren, sodass das dorsale Ende des Gehirns dem Träger anlag. Anschließend wurden mithilfe des Kryostaten (Leica CM1950; -20° C) 40 µm dicke Gefrierschnitte der Gehirne in koronarer Ebene angefertigt. Für die Auswertung der APPA4-positiven Sphäroide fanden die Schnitte aus der Region 265 bis 295 Verwendung (Sidman et al.).

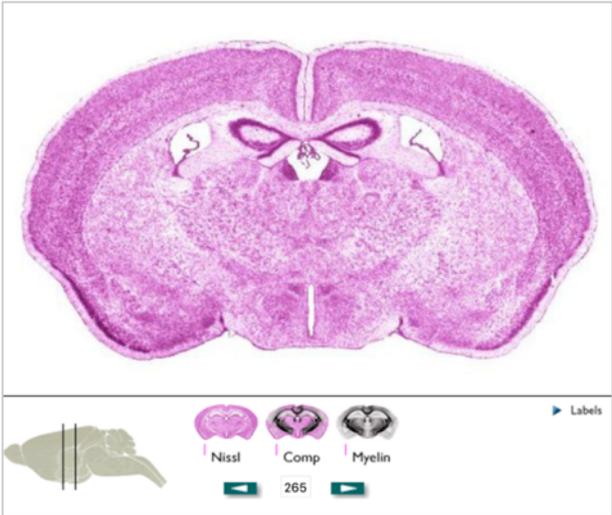


Abbildung 2: Region 265 in Frontalansicht (Sidman et al.)

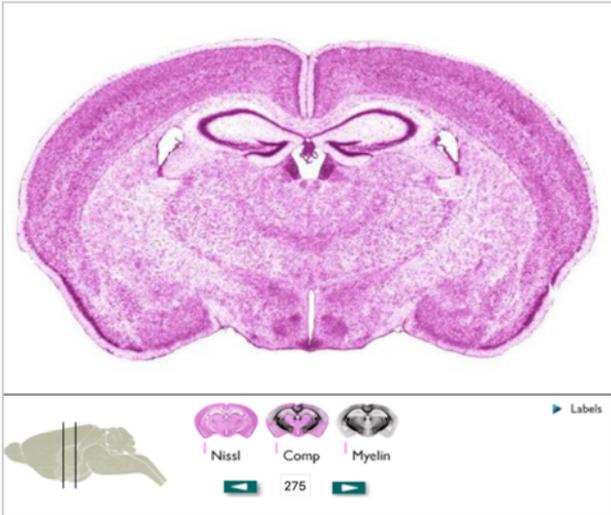


Abbildung 3: Region 275 in Frontalansicht (Sidman et al.)

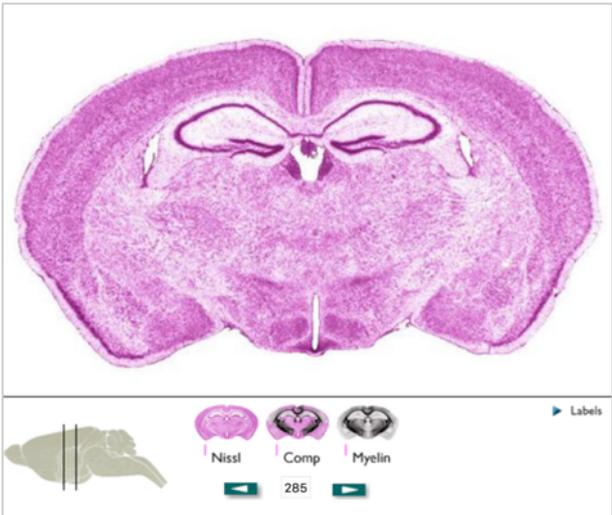
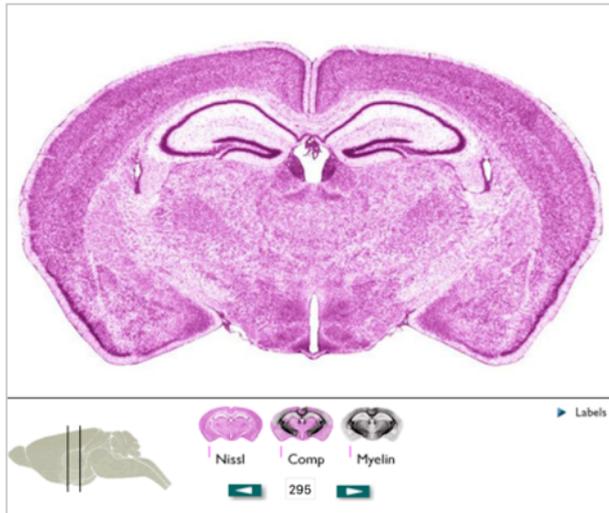


Abbildung 4: Region 285 in Frontalansicht (Sidman et al.)



**Abbildung 5: Region 295 in Frontalansicht (Sidman et al.)**

Die Schnitte der Region 265 bis 295 wurden für die direkt folgenden IF-Färbungen frei flottierend in 24-Well-Platten aufbewahrt. In jedem Well befand sich 1 ml PBS-Spüllösung. Die Schnitte der Region 215-265 (Sidman et al., siehe Abbildung 1) sowie die Schnitte ab Region 295 wurden in dem Aufbewahrungspuffer bei  $-20^{\circ}\text{C}$  verwahrt. Der Puffer wurde wie in Tabelle 7 ersichtlich angefertigt.

**Tabelle 7: Herstellung des Aufbewahrungspuffers**

Hergestellte Lösungen	Substanz	Menge
Herstellung des $\text{PO}_4$ -Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 65 g</li> <li>- 15 g</li> <li>- 2 ml</li> <li>- destilliertes Wasser</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}</math></li> <li>- NaOH</li> <li>- 5N HCL (pH=7,2-7,4)</li> <li>- auf 400 ml</li> <li>Gesamtlösung auffüllen</li> </ul>
Herstellung von 500 ml der Gebrauchslösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 ml</li> <li>- 150 ml</li> <li>- 150 ml</li> <li>- 150 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10x <math>\text{PO}_4</math>-Puffer</li> <li>- Aqua Bidest</li> <li>- Glycerol 99 %</li> <li>- Ethylenglykol</li> </ul>

### 3.1.3 Histologische Untersuchung des Materials

Anschließend folgte die histologische Untersuchung der Kryoschnitte mithilfe von immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen. Diese wurde durchgeführt, um mit dem

Primärantikörper Anti-APPA4 die axonalen Akkumulationen der degenerierten Zellorganellen der Versuchstiere sichtbar zu machen.

Die hierzu benötigten Chemikalien und Materialien sind in Tabelle 8 gelistet.

**Tabelle 8: Chemikalien- und Materialien für die Immunfluoreszenz**

<b>Material/ Chemikalien</b>	<b>Genauere Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
24-Well-Platte	Flacher Boden, unbehandelt	VWR, Darmstadt, Deutschland	734-2325
Bovines Serumalbumin	BSA (Stabilizier)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A-2153
Chrom(III)- Kaliumsulfat		Merck Millipore	1.01036.0250
Cold Fish Skin/Gelatine		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	G-7041
DAPI	Bisbenzimid, H33258	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	14530
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fluka, Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland	03685
Eppendorf Spitzen	0,1-20 µl	VWR, Darmstadt, Deutschland	022492012
Eppendorf Spitzen	2-200 µl	VWR, Darmstadt, Deutschland	0030000870
Eppendorf Spitzen	50-1000 µl	VWR, Darmstadt, Deutschland	0030000919
Eppendorf Tubes	1,5 ml Eppendorf	VWR, Darmstadt,	0030120.086

(Eppi's)		Deutschland	
Eppendorf Tubes (Eppi's)	2,0 ml Eppendorf	VWR, Darmstadt, Deutschland	0030120.094
Einkanalpipetten	100-1000 µl Eppendorf	VWR, Darmstadt, Deutschland	613-0866
Einkanalpipetten	10-100 µl Eppendorf	VWR, Darmstadt, Deutschland	613-0864
Filterpapier	Ø 240 mm	Schleicher & Schuell, Düren, Deutschland	594 1/2
FluorPreserve Reagent		Millipore	345787-25ML
Gelatine		Merck	4078.0500 631-0108
Kyroröhrchen	5 ml Kyroröhrchen (PP) mit Schraubdeckel mit Silikondichtung	neoLab, Heidelberg, Deutschland	7-8065
Normal Donkey Serum		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	D9663
Primärantikörper	Anti-Alzheimer Precursor-Protein A4	Millipore, Darmstadt, Deutschland	MAB 348A4
Sekundärantikörper	Donkey-anti-mouse, Alexa Fluor 594	Millipore, Darmstadt, Deutschland	A 21203
Superfrost®- Objekträger		VWR	631-0912
Thermo- Inkubationsmischer		VWR International GmbH Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt	PEQL 13321

Tris (Pufferan®)		Roth, Karlsruhe, Deutschland	4855.2
Tween 20	(detergent and surface tension reducer)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	P-1379
Wasserstoffperoxid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	8070.4

### **Etablierung der immunfluoreszierenden APPA4-Free-Floating-Färbung**

Vor Beginn der Färbung wurden Untersuchungen durchgeführt, um ein spezifisches Färbeprotokoll zu erstellen. Im ersten Schritt wurden die Materialien und Konzentrationen für die Färbung der frei flottierenden Schnitte getestet und ausgewertet.

Mit 40 µm dicken Kryo-Schnitten wurde getestet, in welchem Aufbewahrungsbehältnis die Schnitte am schonendsten gefärbt werden können. Hierzu wurden pro Methodik 2 Schnitte getestet. Erprobt wurden Glasschalen mit einem Durchmesser von 5 cm sowie beschichtete und unbeschichtete 24-Well-Platten aus Kunststoff.

Die unbeschichteten 24-Well-Platten stellten sich am geeignetsten heraus. Die Proben hafteten weder an der Kunststoffwand der Platten noch untereinander, da sich pro Well ein Schnitt befand.

Es wurden verschiedene Methoden der hitze-induzierten Antigendemaskierung durchgeführt, um eine verbesserte Immunreaktivität zu erreichen. Die untersuchten Lösungen waren Tris-EDTA, Citrat und Phosphat-Puffer. Tabelle 9 und 10 listen die verwendeten Substanzen zur Herstellung von TrisEDTA und Citrat.

**Tabelle 9: Herstellung von TrisEDTA-Puffer (5 l)**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Spezielle Bedingungen</b>
Tris	6,05 g	pH-Wert-Einstellung auf 9
EDTA	1,85 g	
Destilliertes Wasser	5 Liter	

**Tabelle 10: Herstellung von Citrat- Puffer (10l)**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Spezielle Bedingungen</b>
Zitronensäure	21 g	pH-Wert-Einstellung auf 6
Destilliertes Wasser	10 Liter	

Das 20-minütige Kochen der Schnitte bei konstanten 80°C in Tris-EDTA in einem Thermo-Inkubationsmischer erwies sich als die schonendste Variante der Antigendemaskierung. Bei längerem Kochvorgang oder anderen Pufferlösungen klebten die Schnitte häufig an den Wänden der Well-Platten oder verzogen sich.

Des Weiteren wurde auf der Basis standardisierter Färbeprotokolle eine Verdünnungsreihe des primären Antikörpers APPA4 (Milipore, MAB348) in den Verdünnungen 1:1000, 1:2000 und 1:4000 durchgeführt, um zu ermitteln, unter welcher Verdünnung die kontrastreichste Färbung erzielbar ist. Die Inkubationszeit des ersten und zweiten Antikörpers wurde zwischen 5 und 24 Stunden variiert.

Folgende Herangehensweise stellte sich als die optimale Methodik dar:

Die Konzentration von 1:1000 des Primärantikörpers war bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden am besten geeignet. Der Sekundärantikörper zeigte das beste Signal bei einer Konzentration von 1:500 nach 5 Stunden Inkubationszeit.

### **Modifizierung der Objektträger**

Um eine bessere Haftung der 40µm-dicken Kryo-Schnitte zu erzielen, wurden Superfrost®-Objektträger mit 0,5 % Gelatine beschichtet. Hierfür wurden 2,5 g Gelatine in 500 ml destilliertem Wasser aufgelöst und unter konstantem Rühren auf 60° C erhitzt. Bei erreichten 60° C wurde 0,35 g Chrom(III)-Kaliumsulfat hinzugegeben und die Lösung anschließend filtriert. Die Superfrost®-Objektträger wurden in diese Lösung eingetaucht und über Nacht bei 60° C getrocknet.

Die Modifizierung der Superfrost®-Objektträger ist in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Modifizierung der Objektträger**

<b>Lösung</b>	<b>Chemikalien</b>
0,5 % Gelatine	<ul style="list-style-type: none"><li>- 500 ml destilliertes Wasser</li><li>- 2,5 g Gelatine unter Rühren in destillierten Wasser auflösen und langsam auf 60° C erhitzen</li><li>- 0,25 g Chrom(III)-Kaliumsulfat dazugeben und auflösen</li><li>- Lösung filtrieren</li></ul>

### **Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung**

Drei der gleichbehandelten Versuchstiere (C57BL/6, Janvier, Frankreich, Tiernummern: TM169, TM170 und TM171) und drei der Kontrolltiere (C57BL/6, Janvier, Frankreich; Tiernummern: TM173, TM174 und TM175) wurden hierbei histologisch untersucht.

Die Präparate befanden sich während der Färbung frei flottierend in unbeschichteten 24-Well-Platten, um eine homogene Inkubation und Spülung zu ermöglichen. Spülungen schlossen sich an die Inkubationszeiten an, um Rückstände der Lösungen zu entfernen. Die verwendeten Lösungen wurden in die 24-Well-Platten gegeben und anschließend wieder abgesaugt. Während den Inkubations- und Spülzeiten befanden sich die 24-Well-Platten stets auf einem Schüttler, um eine möglichst gute Benetzung und ein vollständiges Durchdringen der Lösungen zu gewährleisten. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, sofern nicht explizit anders erwähnt.

Die Spülvorgänge wurden, immer gleich durchgeführt. Zu Beginn wurde zwei Mal mit frischer PBS-Waschlösung für jeweils 15 Minuten gespült. Für eine verbesserte Permeabilität der Membran folgte ein 15-minütiger Waschvorgang mit dem 0,1%igen Detergent Triton X-100 in PBS.

Daraufhin wurden die formalinfixierten Präparate demaskiert, indem pro Schnitt 1 ml Tris-EDTA je Eppendorf-Tube appliziert und auf 80° C erwärmt wurde. In das vorgewärmte Tris-EDTA wurden die Schnitte mit einem Glashäkchen in Eppendorf-Tubes übergeführt und 20 Minuten unter konstanten 80° C gekocht.

Anschließend wurden die Schnitte zwei Mal mit PBS und einmal mit 0,1% Triton/PBS gespült.

Um die unspezifische Proteinbindung der Antikörper durch die Aktivität der endogenen Peroxidase zu verhindern, wurde ein 2%iger Peroxidase-Block, aus Esel stammend, für zwei Stunden auf die Schnitte pipettiert, bevor der Primärantikörper Anti-APPA4 für 12 Stunden appliziert und bei 4° C inkubiert wurde. Pro Schnitt fanden jeweils 300 µl des Peroxidase-Blocks sowie des Primärantikörpers Verwendung. Tabelle 12, 13 und 14 zeigen die Herstellung des Peroxidase-Blocks, des Primär- und des Sekundärantikörpers.

**Tabelle 12: Herstellung des Peroxidaseblocks (10 ml) in der Konzentration 1:50**

Substanz	Menge	Spezielle Bedingungen
Normalserum (aus Esel stammend)	0,2 ml	pH-Wert-Einstellung auf 7,4,  Inkubation auf Inkubationsschüttler
Cold Water fish skin gelatin	0,01 g	
BSA	0,1 g	
10%iges Tween20	50 µl	
PBS	9,8 ml	

**Tabelle 13: Herstellung der Primärantikörper-Lösung**

Substanz	Menge: 2000 µl	Spezielle Bedingungen
Peroxidaseblock	1998 µl	Inkubation auf Inkubationsschüttler
Primärantikörper (1:1000)	2 µl	

Der Primärantikörper wurde nach der Inkubation herausgespült und der fluoreszierende Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:500 mit 300 µl pro Schnitt appliziert.

**Tabelle 14: Herstellung der Sekundärantikörper-Lösung**

Substanz	Menge: 2000 µl	Spezielle Bedingungen
5 % NGS in PBS/0,1% Triton	1996 µl	lichtgeschützte Aufbewahrung,  Inkubation auf Inkubationsschüttler
Sekundärantikörper (1:500)	4 µl	

Ab diesem Schritt wurden die Präparate lichtgeschützt aufbewahrt, um das Signal der Fluorochrome nicht durch Lichteinwirkung zu schwächen.

Nach einem weiteren Spülvorgang mit der reinen PBS-Waschlösung erfolgte die blau fluoreszierende Zellkerngegenfärbung mit DAPI 4'6'-Diamidino-2-phenylindol-Lösung (DAPI). Die Herstellung ist folgend tabellarisch aufgelistet:

**Tabelle 15: Herstellung der DAPI-Lösung in der Konzentration 1:50**

Substanz	Menge: 1200 µl	Spezielle Bedingungen
DAPI-Stock A	12 µl	lichtgeschützte Aufbewahrung,  Inkubation auf Inkubationsschüttler
DAPI-Stock B	12 µl	
Destilliertes Wasser	1176 µl	

Die Präparate wurden 10 Minuten mit der DAPI-Lösung versetzt und anschließend zwei Mal 10 Minuten in destilliertem Wasser gespült.

Die gefärbten Schnitte wurden aus dem destillierten Wasser mithilfe eines Pinsels entnommen und auf den selbst angefertigten 0,5 % Superfrost®-Gelatine-Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden ohne Kontakt zu den Schnitten mit Fließpapier getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte unter der Verwendung von FluorPreserve® eingedeckt.

Um einen Luftpfeinschluss zu vermeiden, wurde durch leichten Pinzettendruck auf das Deckglas die eingeschlossene Luft verdrängt.

Die Präparate wurden nach 12 Stunden Trocknung bei Raumtemperatur lichtgeschützt bei -20° C aufbewahrt.

**Tabelle 16: Übersicht der IF APPA4-Free-Floating-Färbung**

	<b>Schritt</b>	<b>Funktion</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Zeit</b>
1.	Waschen	Ausspülen der Aufbewahrungslösung	2x PBS	1 ml pro Well	2x 15 Min.
2.	Waschen	Steigerung der Permeabilität der Membran	1x PBS/0,1% Triton	1 ml pro Well	15 Min.
3.	HIER (heat induced epitope retrieval)	Demaskierung	Tris/EDTA	1 ml pro Eppendorf-Tube	30 Min.
4.	Waschen	Ausspülen der Aufbewahrungslösung	2x PBS	1 ml pro Well	2x 15 Min.
5.	Waschen	Steigerung der Permeabilität der Membran	1x PBS/0,1% Triton	1 ml pro Well	15 Min.
6.	Blocking	Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen	2% Esel-Peroxidase-Block	300 µl pro Well	Zwei Stunden
7.	Primärantikörper	Bindung an Zielstruktur	Anti-APPA4 (Konzentration 1:1000)	300 µl pro Well	Über Nacht (mind. 8 Stunden)
8.	Waschen	Ausspülen der Aufbewahrungslösung	2x PBS	1 ml pro Well	2x 15 Min.
9.	Waschen	Steigerung der Permeabilität der Membran	1x PBS/0,1% Triton	1 ml pro Well	15 Min.

10.	Sekundär-antikörper	Bindung an Primärantikörper	Dinkey anti-mouse, Alexa Fluor (Konzentration 1:500)	300 µl pro Well	5 Stunden
11.	Waschen	Ausspülen der Aufbewahrungslösung	2x PBS	1 ml pro Well	2x 15 Min.
12.	Waschen	Steigerung der Permeabilität der Membran	1x PBS/ 0,1% Triton	1 ml pro Well	15 Min.
13.	Zellkern-Gegenfärbung	DAPI (4'6'-Diamidino-2-phenylindol)-Lösung	DAPI-Stock B (Konzentration 1:10)	300 µl pro Well	10 Min.
14.	Waschen	Ausspülen der Aufbewahrungslösung	2x PBS	1 ml pro Well	2x 15 Min.
15.	Waschen	Steigerung der Permeabilität der Membran	1x PBS/ 0,1% Triton	1 ml pro Well	15 Min.
16.	Eindeckeln der Schnitte	Lagerungsfähigkeit der Schnitte	FluorPreserve Reagent	1 ml pro Schnitt	

### Validierung der Färbung

Als Nachweis der spezifischen Bindung des Primärantikörpers Anti-APPA4 wurden eine Negativ-Kontrolle und eine Isotyp-Kontrolle angefertigt.

Bei der Negativ-Kontrolle wurde nur das Normalserum (ohne Primärantikörper) auf den Schnitt appliziert. Da keine Färbung stattfand, lagen keine unspezifischen Antikörperbindungen vor, sodass die Kontrolle negativ war.

Die Isotyp-Kontrolle diente der Beurteilung der Hintergrundfärbung. Der Isotyp ist ein Antikörper, der aus der gleichen Spezies wie der Primärantikörper gewonnen wird und den gleichen Subtyp aufweist, jedoch keine spezifischen Bindungen eingeht. Der Subtyp des Primärantikörpers Anti-APPA4 ist der Klon 22C11. Bei der APPA4-Färbung handelt es sich

um den Isotyp IgG1. Für die Isotyp-Kontrolle wurde der Primärantikörper gegen die Isotyp-Kontrolle getauscht. Da auch hier keine Färbung vorlag, kam es zu keiner unspezifischen Bindungsreaktion. Auch diese Kontrolle war somit negativ.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop (OLYMPUS BX51WI mit OLYMPUSBX-DSU und SOLA LED) wurde die Qualität der Fluoreszenzfärbungen kontrolliert. Hierbei wurde auf ein ausreichend starkes Signal des zweiten Antikörpers (Alexa Fluor 594; rotes Signal) und der Zellkern-Gegenfärbung (DAPI; blaues Signal) getestet. Bei schwach leuchtender Hintergrundfärbung waren beide Signale deutlich erkennbar.

Des Weiteren wurden die Färbungen an Präparaten der Kontrolltiere des Versuches durchgeführt, um die Abwesenheit der APPA4-positiven Sphäroide nachzuweisen. Bei ausbleibender fluoreszierender Färbung trotz desselben Färbeprotokolls ist davon auszugehen, dass sich keine APPA4-Proteine in den Axonen der Kontrolltiere befinden. Da die Schnitte kein fluoreszierendes Signal zeigten, galt die Abwesenheit von APPA4-positiven Sphäroiden bei den Kontrolltieren als bestätigt.

## 3.2 Auswertung der IF- und elektronenmikroskopischen (EM)-Daten

### 3.2.1 Analyseverfahren der IF-Daten

**Tabelle 17: Materialien für die Auswertung der IF-Daten**

Forschungsutensilien	Genaue Bezeichnung	Firma
Präklinische Forschungsorganisation	SBF-SEM: SigmaVP scanning electron microscope, Carl Zeiss®  3View, Carl Zeiss®	RenovoNeural®, Cleveland, USA
Bildbearbeitungsprogramm	Image J®	
3D-Rekonstruktions-programm	NeuroLucida®360	MBF Bioscience®, Delft The Netherlands
3D-Rekonstruktions-programm	BioVis3D®	BioVis3D®
DSU-Fluoreszenzmikroskop	OLYMPUS BX51WI mit OLYMPUSBX-DSU und SOLA LED	Olympus

## Einscannen der IF-Präparate

Mithilfe des konfokalen Fluoreszenzmikroskops (OLYMPUS BX51WI mit OLYMPUSBX-DSU®) und dem Programm StereoInvestigator® wurden die Präparate per 3D-Scan digitalisiert.

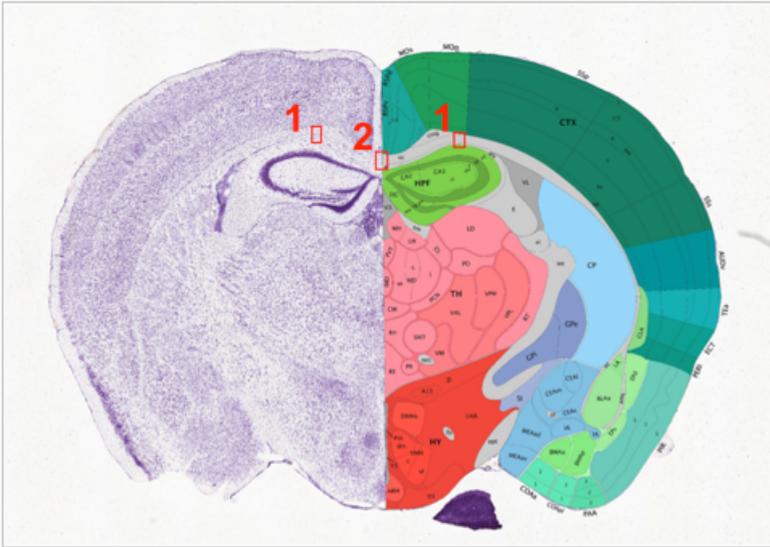
Es wurden Übersichtsaufnahmen bei vierfacher Vergrößerung sowie Aufnahmen der Region of Interest (ROI) bei 40-facher Vergrößerung erstellt. Die Schichtdicke der konfokalen Scans in der z-Ebene betrug jeweils 0,2 µm. Die Scans wurden als jpx.-Dateien formatiert.

Um ein optimales Signal der Färbung zu erzielen, wurden die Parameter Belichtung (engl. exposure), Lichtempfindlichkeit (engl. sensitivity), Kameraabgleich (engl. offset) und die Bindung von Pixelblöcken (engl. binning) variiert. Die Kameraeinstellungen während des Scanvorgangs mit StereoInvestigator® wurden schlussendlich wie in Tabelle 18 gelistet festgelegt:

**Tabelle 18: Kameraeinstellung zum Anfertigen der IF-Scans mit StereoInvestigator®**

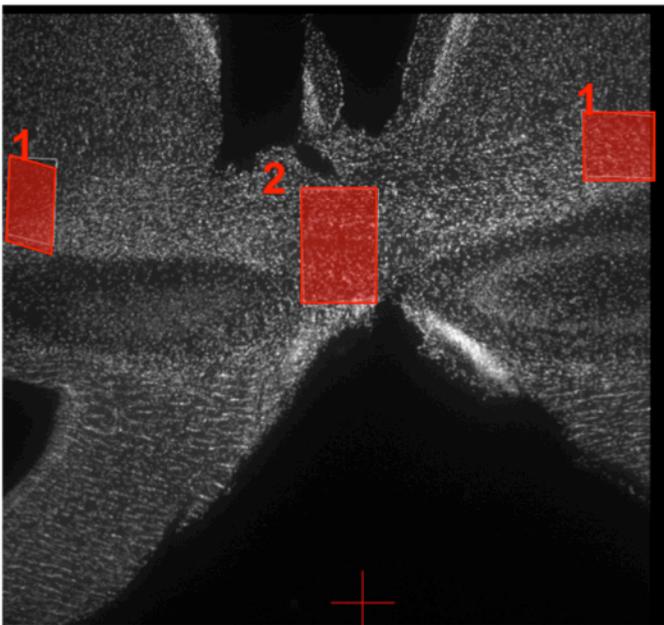
<b>Kamera-Einstellung zum Einscannen des DAPI-Signales</b>	<b>Kamera-Einstellung zum Einscannen des Anti-APPA4--Signales</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Exposure: 30,590 ms; 70 %</li><li>- Sensitivity: 0</li><li>- Offset: 0</li><li>- Binning: 1</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Exposure: 181,420 ms; 70 %</li><li>- Sensitivity: 13</li><li>- Offset: 0</li><li>- Binning: 1</li></ul>

Das mittlere Corpus Callosum (CC) (1) sowie das medio-laterale CC (2) in den Regionen (Sidman et al.) 265, 275 und 285 wurden als ROI festgelegt (Abbildung 6 und 7). Der untersuchte Bereich der beiden definierten ROIs betragen jeweils 200 µm<sup>2</sup>.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der ROI**

- (1): laterales CC der Region 265 (Sidman et.al.) in der Frontalansicht
- (2): mediales CC der Region 265 (Sidman et.al.) in der Frontalansicht



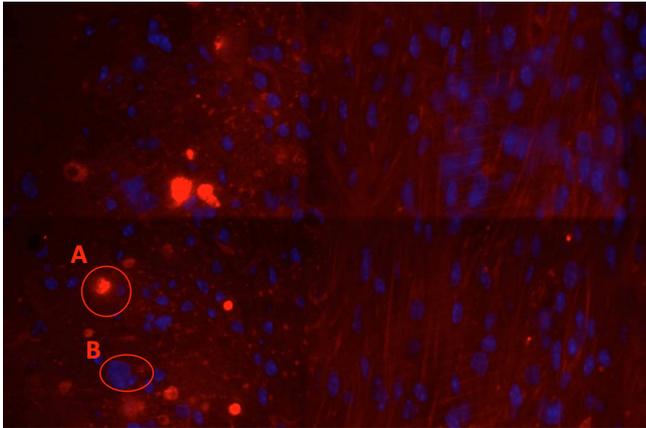
**Abbildung 7: Übersichtsaufnahme der IF-Präparate mit markierten ROI**

- (1): laterales CC der Region 265 (Sidman et.al.) in der Frontalansicht
- (2): mediales CC der Region 265 (Sidman et.al.) in der Frontalansicht

Konfokale Scans mit einer Schichtdicke von 0,2 µm und einer vierfachen Vergrößerung angefertigt

## Auswertungen der IF-Präparate mit Neurolucida360®

Die Auswertung der Dateien erfolgte mit dem Programm Neurolucida360®. Die Einstellungen und der Maßstab aus dem Programm Stereo Investigator® wurden automatisch von Neurolucida360® übernommen.



**Abbildung 8: ROI Nr.1 in dem Scan der IF-Free-Floating- APPA4-Färbung in 40-facher Vergrößerung.**

(A): APPA4-positiver Sphäroide, rot fluoreszierend bei der Wellenlänge  $\lambda=495$  nm

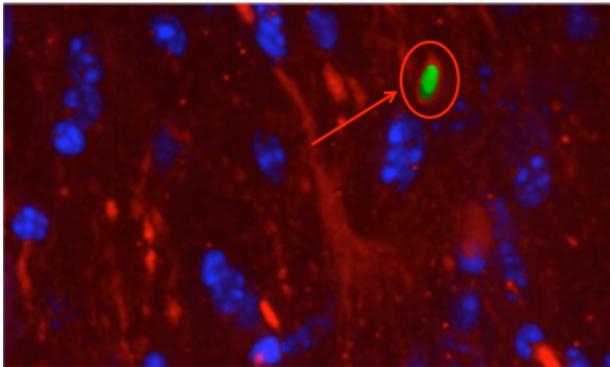
(B): DAPI-gefärbter Nukleoli, blau fluoreszierend bei der Wellenlänge  $\lambda=350$  nm

Zur Analyse der Messgrößen wurde durch Feineinstellung des Kontrasts und der Helligkeit die Signalausgabe optimiert. Kontrast und Helligkeit wurden hierbei individuell für jeden Scan zur genauen Detektion der Zielstrukturen eingestellt, um das Signal der Hintergrundfärbung zu minimieren und jenes der Zielstrukturen zu maximieren. Die Einstellungen wurden jeweils individuell für das ausgewählte Signal eingestellt

Aufgrund der angefertigten Doppelfärbung wurde bei der Analyse der Zellkerne das rot fluoreszierende Anti-APPA4-Signal deaktiviert, bei der Analyse der APPA4-positiven Sphäroide hingegen das DAPI-Signal, um die optische Abgrenzbarkeit zu erhöhen.

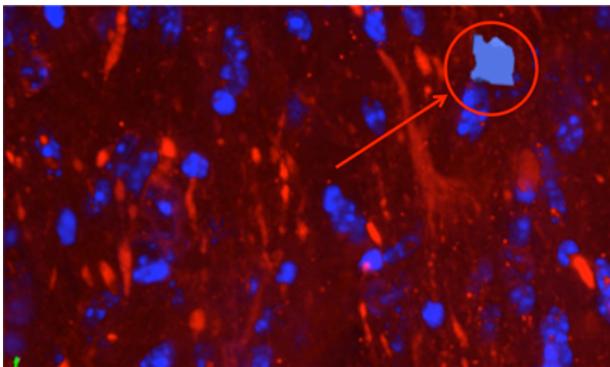
Um die Zielstrukturen in ihrem Ausmaß genau detektieren zu können, wurden die Grundeinstellungen den Sphäroiden angepasst. Die Grundeinstellungen bestehen aus der Sensitivität der Somadetektion („soma detector sensitivity“), der interaktiven Detektionsfläche („interactive search region“) und der Größeneinschränkung der Detektion („size constraint“). Die eingestellte Größeneinschränkung betrug  $1 \mu\text{m}$ . Die Sensitivität der Somadetektion sowie die Detektionsfläche wurden abhängig von der Größe der Zielstruktur variiert.

Die Abbildungen 9-11 zeigen die Justierung der Grundeinstellung zur Somadetektion:



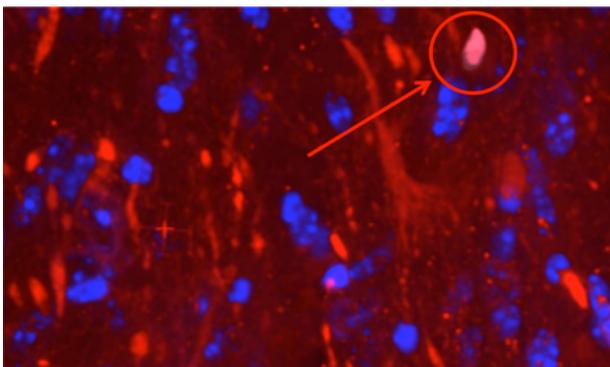
**Abbildung 9: Signal-Einstellung: Sensitivität der Somadetektion (1)**

Beispiel eines beliebigen Sphäroids: Sensitivität zu gering gewählt



**Abbildung 10: Signal-Einstellung: Sensitivität der Somadetektion (2)**

Beispiel eines beliebigen Sphäroids: Sensitivität zu stark gewählt

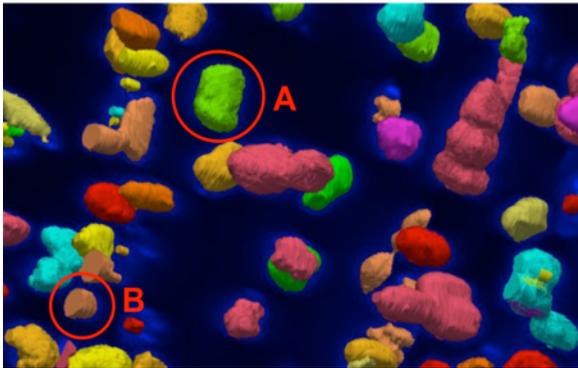


**Abbildung 11: Signal-Einstellung: Sensitivität der Somadetektion (3)**

Beispiel eines beliebigen Sphäroids: Sensitivität optimal eingestellt

Abhängig von der Fragestellung wurden Somata des Scans, wie etwa Zellkerne oder Sphäroide, markiert.

Damit die Somata von Zellkernen oder Sphäroide in die Analyse mit einbezogen werden konnten, mussten die Vollständigkeit der Struktur innerhalb des Scans und die Möglichkeit genauer Detektion durch das Programm Neurolucida360® gewährleistet sein. Als vollständig galten die Somata, sobald sie in keine der drei Raumachsen x, y, z angeschnitten waren, wie Abbildung 13 veranschaulicht. Abbildung 12 zeigt die Überprüfung der markierten Strukturen in der 360°-Ansicht.

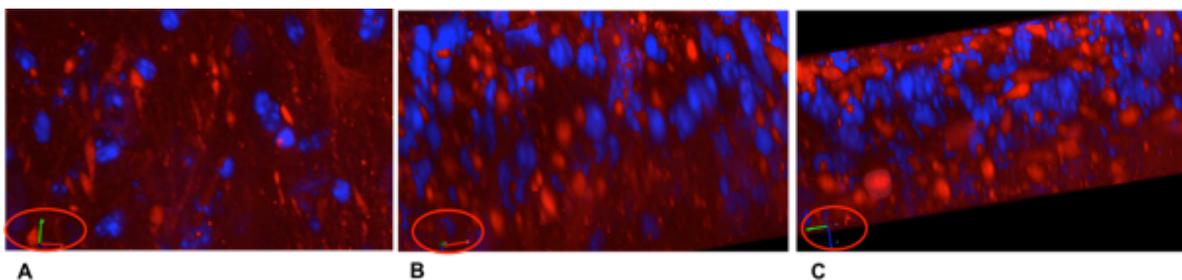


**Abbildung 12: Kontrolle auf Vollständigkeit der Zielstrukturen mit Neurolucida360®**

Beispiel detektierter APPA4-positiver Sphäroid in der 360° Ansicht

(A): Beispiel nicht angeschnittener Sphäroid

(B): Beispiel angeschnittener Sphäroid



**Abbildung 13: Kontrolle auf Vollständigkeit der Zielstrukturen mit Neurolucida360® (2)**

Beispiel eines APPA4-positiven Sphäroids in allen drei Ebenen in der 360°-Ansicht

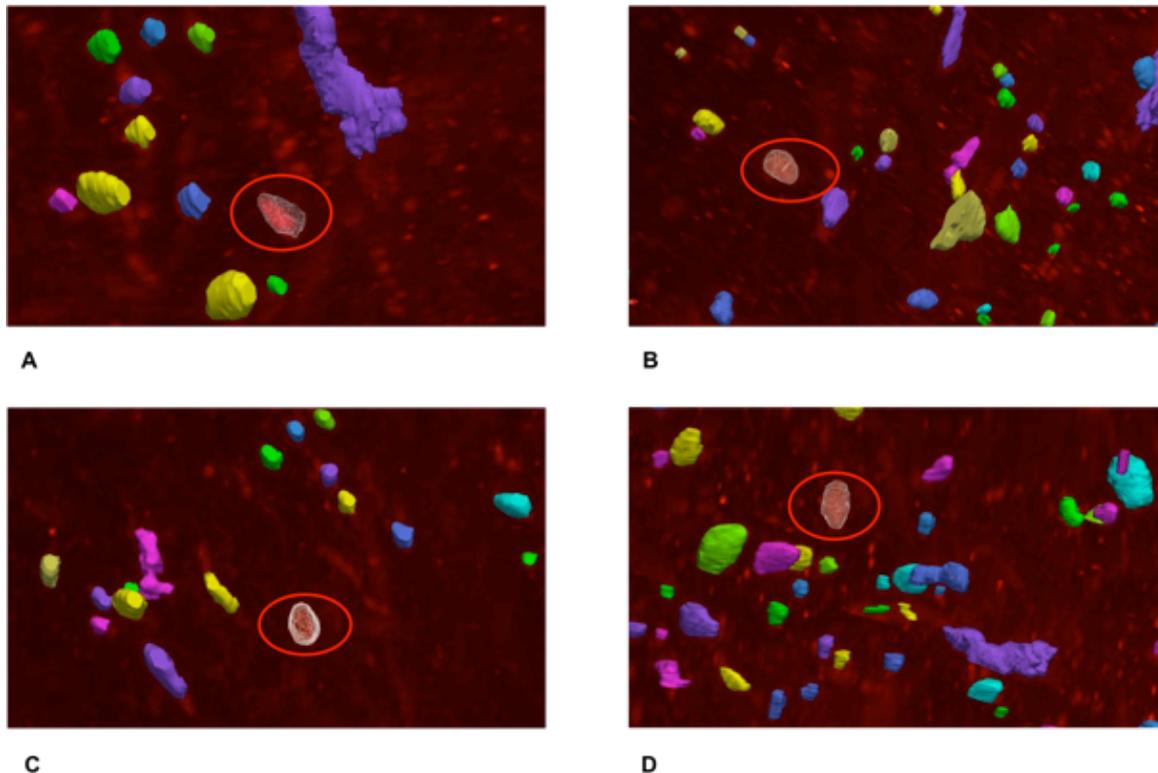
(A): Kontrolle innerhalb der Z-Ebene (=blauer Vektor)

(B): Kontrolle innerhalb der Y-Ebene (=grüner Vektor)

(C): Kontrolle innerhalb der X-Ebene (=roter Vektor)

Die korrekte Detektion der Struktur wurde überprüft, indem die Markierung transparent eingefärbt und in allen Raumebenen kontrolliert wurde, wie in Abbildung 14 dargestellt. Hierbei sind die korrekten Grundeinstellungen ausschlaggebend für die korrekte Markierung.

Als richtig markiert galten Strukturen, bei denen die dreidimensionale Markierung der Körper in allen drei Raumebenen exakt mit dem fluoreszierenden Signal des Scans übereinstimmte. Als falsch markiert galten sie, wenn die transparent eingefärbte Markierung das Fluoreszenzsignal überlappte oder nicht vollständig umfasste.



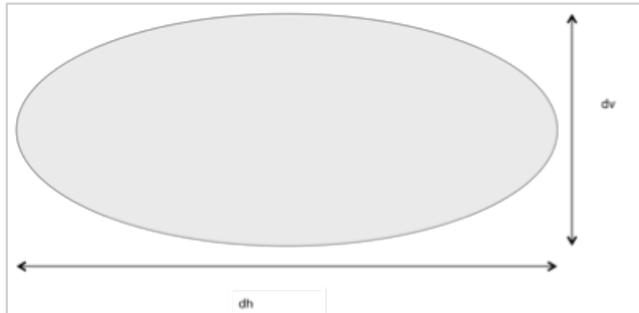
**Abbildung 14: Detektion von Zielstrukturen mit Neurolucida360®**

Beispiels eines APPA4-positiven Sphäroids; Kontrolle der Richtigkeit der Detektion durch transparente Darstellung der Markierung

- (A): aufgrund zu starker Sensitivität bei der Soma-Detektion zu groß markiertes Areal des APPA4-positiven Sphäroids
- (B): korrekt markiertes APPA4-positives Sphäroid, Betrachtung der Y-Achse
- (C): korrekt markiertes APPA4-positives Sphäroid, Betrachtung der X-Achse
- (D): korrekt markiertes APPA4-positives Sphäroid, Betrachtung der Z-Achse

Da sich Somata mit einem maximalen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  der kürzeren Seite des Sphäroids bei maximaler Detektionssensitivität des Programms unzureichend genau messen ließen, wurden nur Strukturen mit einer größeren Nebenachse in die Messung mit einbezogen (siehe Abbildung 15). Die Nebenachse eines elliptoiden Körpers entspricht dem Durchmesser der kleineren Seite einer Ellipse. Das Volumen der Sphäroide, die den

Einschlusskriterien entsprachen, wurde mit Neurolucida360® berechnet, und als DAT.-Datei gespeichert.

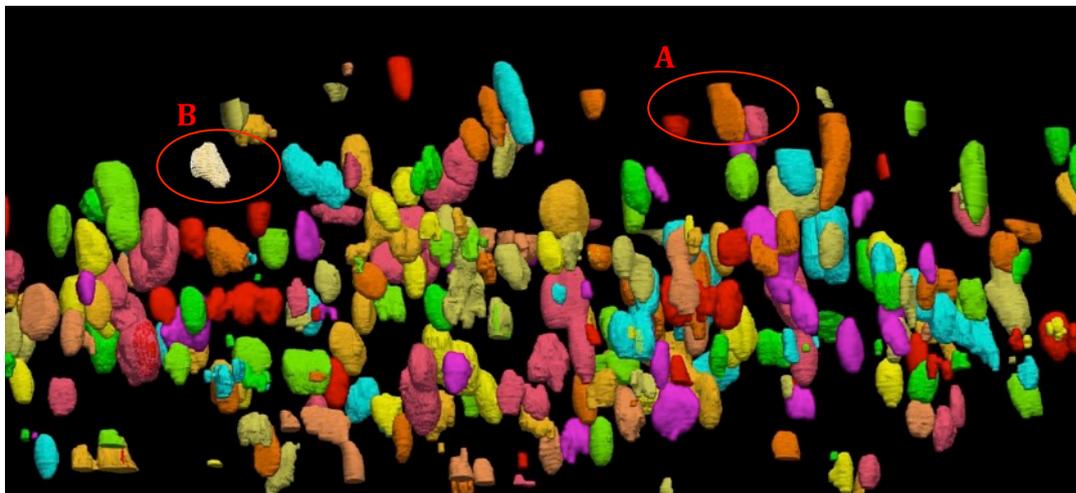


**Abbildung 15: Messung der Nebenachse der Sphäroide**

Hier: Messung der Nebenachse „dv“ an der größten Stelle

### **Auswertungen der IF-Präparate mit Neurolucida Explorer®**

Die erstellten DAT.-Dateien wurden mit dem Programm NeurolucidaExplorer® geöffnet und die zu analysierende Zielstruktur ausgewählt. Eine erneute Kontrolle der richtigen Detektion wurde wie in Abbildung 16 und Abbildung 17 dargestellt durchgeführt.

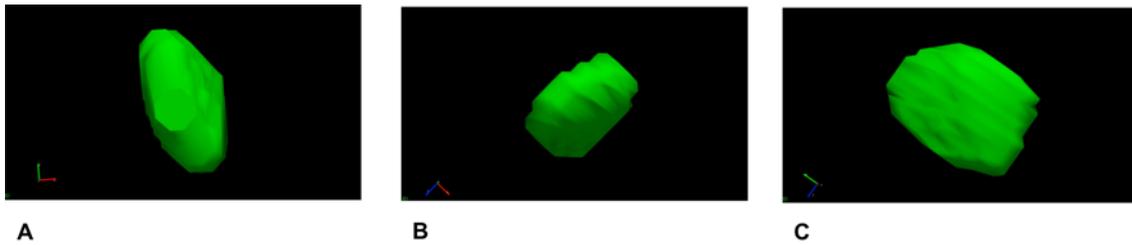


**Abbildung 16: Kontrolle auf Vollständigkeit der Zielstrukturen mit NeurolucidaExplorer®**

Beispiel detektierter APPA4-positiver Sphäroide innerhalb des gesamten Scans

**(A):** angeschnittener Sphäroid, nicht zur Auswertung geeignet

**(B):** nicht angeschnittener Sphäroid, zur Auswertung geeignet



**Abbildung 17: Kontrolle auf Vollständigkeit der Zielstruktur mit NeurolucidaExplorer®**

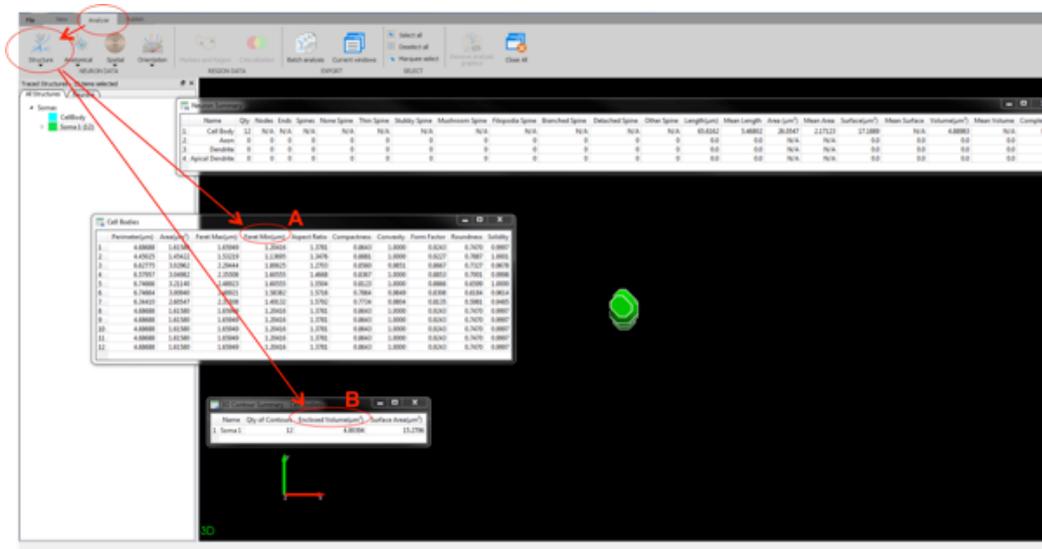
Beispiel eines APPA4-positiven Sphäroids in allen drei Ebenen in der 360°-Ansicht

(A): Kontrolle innerhalb der Z-Ebene

(B): Kontrolle innerhalb der Y-Ebene

(C): Kontrolle innerhalb der X-Ebene

Von Interesse war die Berechnung der Nebenachse und deren Volumen. Das Volumen diente dem Vergleich der IF- und der EM-Daten auf dreidimensionaler Ebene, die Nebenachse der Erstellung des Umrechnungsfaktors und der Einteilung der Sphäroide in Größengruppen. Hierbei eignete sich die Nebenachse mehr als die Hauptsache, da diese geringeren Größenschwankungen unterlag. Beide ließen sich über die Analyse-Funktionen des Programms NeurolucidaExplorer® ermitteln, wie Abbildung 18 zeigt.



**Abbildung 18: Analyse der markierten Zielstrukturen mit NeurolucidaExplorer®**

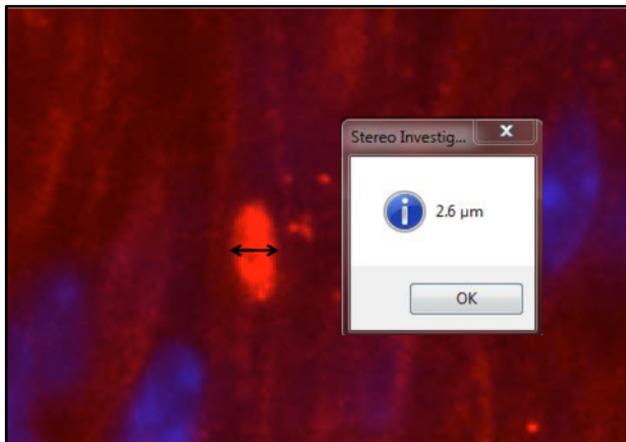
Beispiel eines APPA4-positiven Sphäroids

(A): Berechnung der Nebenachse der Zielstruktur (Maximalwert der „Min. Feret“)

(B): Berechnung des Volumens der Zielstruktur („Enclosed Volume“)

Um die Richtigkeit der Werte zu kontrollieren, wurden Vergleichsmessungen der maximalen Durchmesser durch manuelles Ausmessen mithilfe eines digitalen Lineals in Neurolucida

360® und einer automatischen Analyse in NeurolucidaExplorer® vorgenommen. Die Abbildung 19 zeigt den Vorgang in dem Programm Neurolucida360®.



**Abbildung 19: Ausmessen der Nebenachse mit Neurolucida360®**

Die gemessenen Volumina wurden tabellarisch festgehalten, um sie im weiteren Verlauf mit Werten aus Aufnahmen mit dem Elektronenrastermikroskop zu vergleichen.

### 3.2.2 Analyseverfahren der EM-Daten

**Tabelle 19: Materialien für die Auswertung der EM-Daten**

Materialien	Genauere Bezeichnung	Firma/Institut
3D-Rekonstruktionsprogramm		BioVis3D®
Bearbeitungsprogramm		Image J®
Elektronenmikroskop-Aufnahmen	Biotechnologische Forschungsunternehmen	RenovoNeural®, Cleveland, USA
Tier-Präparate	Tierart: C57BL/6, Janvier, Frankreich	Institut für Neuroanatomie der Uniklinik RWTH Aachen

Für die elektronenmikroskopische (EM) Untersuchung wurden Versuchstiere aus dem gleichen dreiwöchigen Cuprizone-Tiermodells genutzt. Der Versuch fand am Institut für Neuroanatomie der Uniklinik RWTH Aachen statt. Es existierten zwei verschiedene Gruppen

innerhalb des Versuches, die in Tabelle 20 näher erläutert werden. Im Folgenden werden die Versuchstiere unter dem Namen Tier1, Tier2, Tier3 und Tier4 beschrieben.

**Tabelle 20: Versuchsgruppen**

<b>Gruppe 1: Wildtyp</b>	<b>Gruppe 2: Kontrolltiere</b>
0,25 % Cuprizone-Behandlung für 3 Wochen	handelsübliches Futter
N= 4 Tiere	N= 4 Tiere

### **EM-Daten von RenovoNeural®**

RenovoNeural® ist ein biotechnologisches Forschungsunternehmen, das sich auf die Erstellung von EM-Datensätzen mittels SBF-SEM (engl. serial block face scanning electron microscopy; dt. serielle Block-Bildgebung) spezialisiert hat. Das Unternehmen erstellte aus den zur Verfügung gestellten Präparaten des Instituts für Neuroanatomie der Uniklinik RWTH Aachen einen konfokalen Datensatz seriell erstellter Elektronenmikroskopaufnahmen.

Der Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 0,08 µm; die Größe einer Aufnahme 204,54 µm x 61,36 µm = 12550,47 µm<sup>2</sup>. Die Aufnahmen erfolgten in koronarer Ebene von frontal nach okzipital.

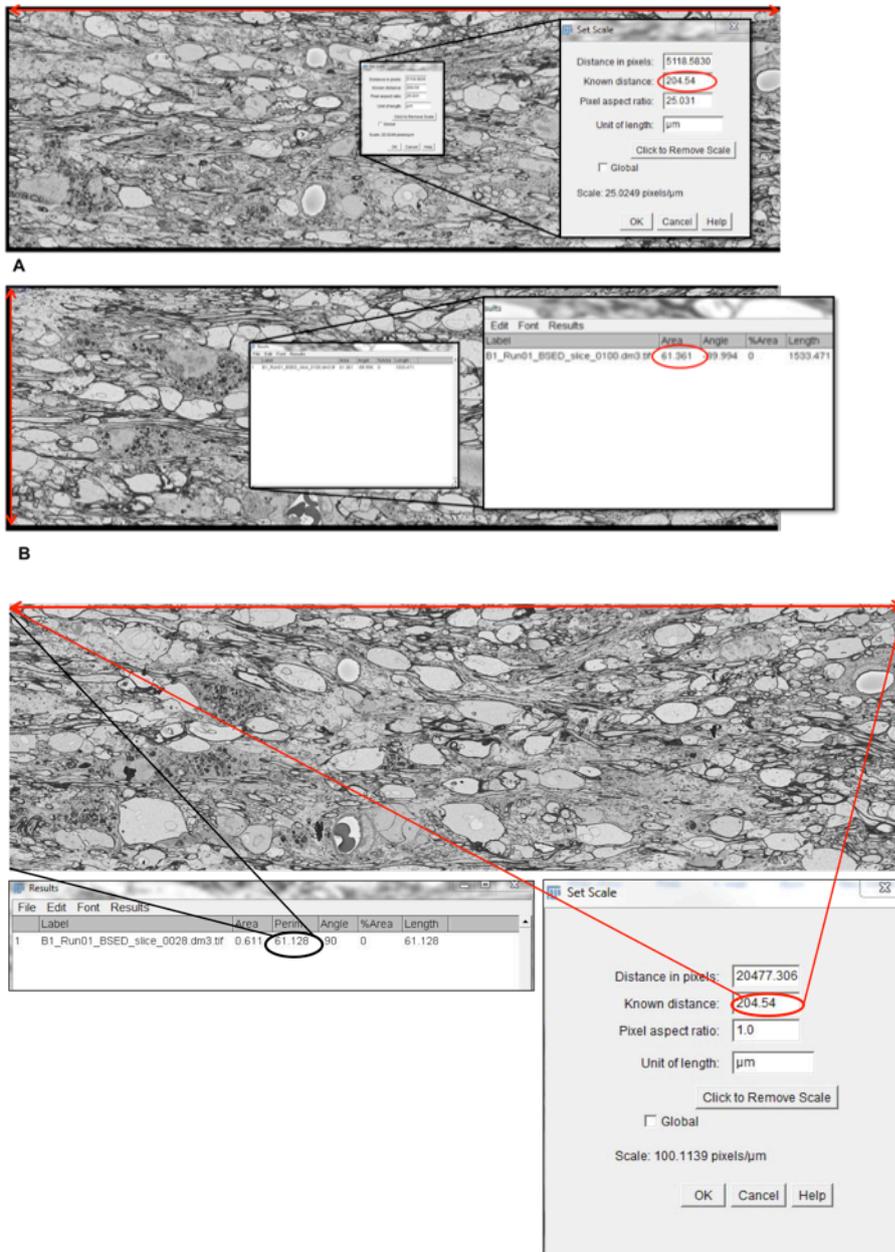
Die Daten wurden in 100%iger, 50%iger und 25%iger Auflösung erstellt. Der 100%-Datensatz enthält eine Pixelgröße von 0,01 µm x 0,01 µm und eine Pixel-Skala von 0,0099874735 µm. Aufgrund der Datei-Größe fand der Datensatz in 25%iger Auflösung Verwendung. Die Scans lagen hierbei als tif.-Dateien vor.

Auch in den EM-Aufnahmen fanden sich axonale Auftreibungen, in denen akkumulierte Zellorganellen in unterschiedlicher Größe, Lokalisation und Anzahl zu sehen waren.

### **Auswertungen der EM-Daten mit ImageJ®**

Für die Auswertung der EM-Daten wurden alle Scans eines Tieres in das Programm ImageJ® geladen. Die Skalierung wurde, wie in Abbildung 20 veranschaulicht, anhand der bekannten Längenangaben eines Bildes (204,54 µm x 61,36 µm) und eines Pixel-Ratios von 1 in dem Fenster „Set Scale“ eingestellt. Die Länge einer Seite wurde in dem Programm markiert und der bekannte Wert hierfür angegeben. Zur Überprüfung der korrekten

Skalierung wurde die andere Länge ausgemessen und mit dem bekannten Wert verglichen. Bei identischen Angaben galt die Skalierung als richtig.



**Abbildung 20: Skalierung des Programms ImageJ®**

**rot:** eine Seite mit bekannter Längenangabe markiert und die entsprechende Länge als „down distance“ in „Set Scale“ eingegeben

**schwarz:** andere Seite mit bekannter Länge nachgemessen und Messwert mit Sollwert verglichen

Nach der Skalierung wurde das Programm für die Arbeit genutzt, um die Berechnung von Geraden und Flächen innerhalb der EM-Daten durchzuführen.

### 3.2.3 Berechnung eines Umrechnungsfaktors zwischen den IF- und den EM-Daten

Zur Minimierung der Fehlerquellen in den Messdaten wurde ein Umrechnungsfaktor zwischen Messangaben der IF-Daten und der EM-Daten erstellt.

Eine mögliche Fehlerquelle ist die unterschiedliche Prozessierung der Gewebe. Während die IF-Präparate durch die Kryoprotektion weniger starken Volumenveränderungen unterlagen, muss durch die Entwässerung der aufsteigenden Alkoholreihe ein stärkerer Wasserentzug bei der Kunstharzeinbettung der EM-Präparate in Betracht gezogen werden. Dieser kann größere Volumenveränderungen zur Folge haben.

Da ein Wasserentzug oder eine -einlagerung Auswirkungen auf das Soma der Zellen, jedoch nicht auf den Zellkern haben können, wurde die Größe der Zellkerne in den IF- und den EM-Daten zur Erstellung eines Umrechnungsfaktors zwischen den Datengruppen genutzt.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Verwendung von zwei Datensätzen, die nicht von derselben Arbeitsgruppe bearbeitet wurden. Trotz gleicher Versuchsprotokolle müssen aufgrund der Durchführung durch verschiedene Personen sowie durch Verwendung der gleichen, jedoch nicht derselben Materialien geringe Differenzen in der Handhabung ausgeschlossen werden. Der Tierversuch für die IF-Präparate wurde am Lehrstuhl für Neuroanatomie (Lehrstuhl II) der LMU München angefertigt, die Präparate mithilfe des OLYMPUS BX51WI und dem Programm StereoInvestigator® digitalisiert, während die EM-Präparate an dem Institut für Neuroanatomie der Uniklinik RWTH Aachen erstellt und von RenovoNeural® mit einem Elektronenmikroskop nach dem „serial block-face scanning electron microscopy“-Verfahren eingescannt wurden.

Zur Berechnung des Umrechnungsfaktors zwischen den IF-Präparaten und den EM-Daten diente die Nebenachse elliptoiden Zellkerne als Referenzwert, wie in Abbildung 15 veranschaulicht. Zur Erstellung des Umrechnungsfaktors wurden randomisiert 300 Zellkerne aus den IF-Scans und 40 Zellkerne aus den EM-Daten ausgewählt und gemessen. Aufgrund der numerisch geringeren Sphäroide in den EM-Daten konnte nicht dieselbe Anzahl an EM-Zellkerne und EM-Sphäroide untersucht werden wie in den IF-Daten.

#### **Berechnung der Nebenachse der Zellkerne in den IF-Präparaten**

Für die Berechnung des maximalen Durchmessers der Zellkerne in den IF-Präparaten wurden 300 Zellkerne randomisiert ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass von jedem Versuchstier (TM269, TM270, TM710) jeweils 100 Zellkerne gemessen und Zellkerne innerhalb der Regionen 265-295 (Sidman et al.) ausgewählt wurden.

Die Berechnung erfolgte über die Programme Neurolucida360® und NeurolucidaExplorer®.

Die jpx.-Dateien der Scans wurden in Neurolucida360® aufgerufen und das rote Anti-APPA4-Signal wurde ausgeschaltet. In der 360°-Ansicht wurden die Grundeinstellungen zur Soma-Detektion eingestellt und alle Zellkerne über die Funktion „detect all somata’s“ markiert.

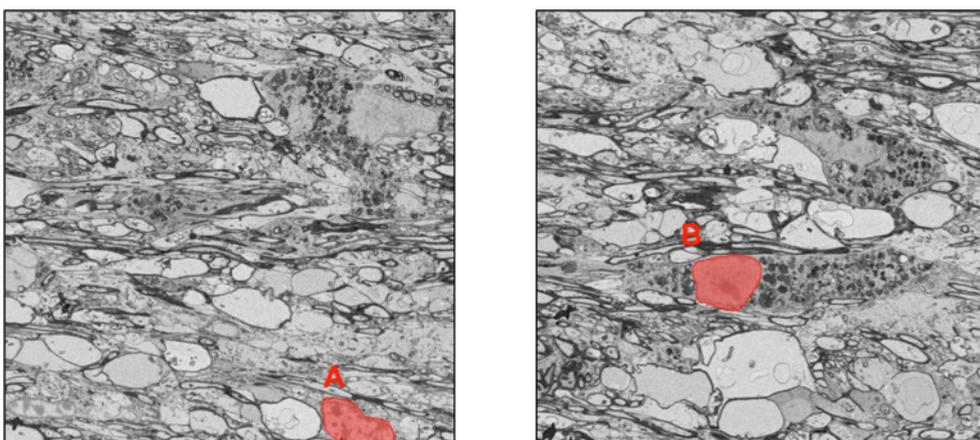
Die Markierungen wurden in allen drei Raumebenen unter transparenter Detektion auf Korrektheit kontrolliert. Richtig markierte Zellkerne wurden anschließend notiert und die Datei als DAT.-Datei gespeichert. Die DAT.-Datei wurde in NeurolucidaExplorer® geöffnet und die markierten Zellkerne wurden erneut auf ihre Richtigkeit kontrolliert.

Die einzelnen Zellkerne wurden einzeln angewählt und analysiert. Angeschnittene Zellkerne wurden bei der Analyse nicht mit einbezogen. Die Werte der Nebenachse der elliptoiden Körper (engl. minimum feret) wurden pro Somata tabellarisch gelistet.

### **Berechnung der Nebenachse der Zellkerne in den EM-Daten**

Die Berechnung der Nebenachse der Zellkerne erfolgte an zehn randomisierten Zellkernen pro Versuchstier des dreiwöchigen Cuprizone-Versuches.

Vollständig erfasste Zellkerne wurden ausgewählt (siehe Abbildung 21) und die Nebenachse durch die Funktion der Längenmessung des Programms ermittelt. Angeschnittene, nicht vollständig vom Scan erfasste Zellkerne, wurden nicht in die Wertung mit einbezogen.

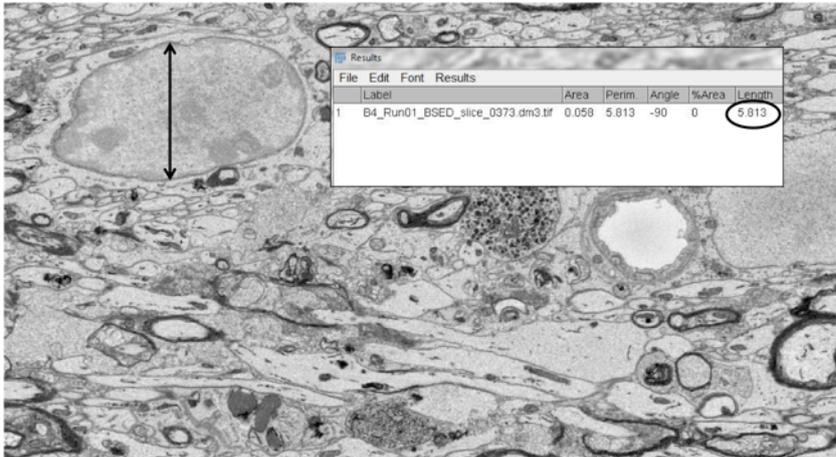


**Abbildung 21: Einschlusskriterium: vollständig erfasste Zellkerne**

(A): Beispiel angeschnittener Zellkern

(B): Beispiel nicht angeschnittener Zellkern

Die Nebenachse ausgewählter Zellkerne wurde auf allen Scans, auf denen die Zellkerne erkennbar waren, gemessen. Anschließend wurde der größte Wert notiert. Abbildung 22 visualisiert die Messung der Nebenachse des Zellkerns mit dem Programm ImageJ®.



**Abbildung 22: Messung der Nebenachse des Zellkerns mit ImageJ®**

Die Markierungen wurden als Roit.-Datei gespeichert. Die berechneten Nebenachsen wurden als Result.-Datei gespeichert.

### **Erstellung des Umrechnungsfaktors**

Der Mittelwert der Nebenachsen der Zellkerne der IF-Präparate und der EM-Daten wurde berechnet. Der Umrechnungsfaktor wurde durch die Division des Mittelwerts der IF-Präparate durch den Mittelwert der EM-Präparate ermittelt.

### **3.2.4 Festlegung weiterer Einschlusskriterien anhand der Nebenachse**

Um neben der Vollständigkeit der Sphäroide weitere Einschlusskriterien zu definieren und somit die Volumina der beiden Gruppen in einem enger definierten Bereich zu analysieren, wurde die Größenverteilung der Sphäroide untersucht. Hierbei wurde, wie in Abbildung 24 ersichtlich, die Nebenachse der elliptoiden Körper als Kriterium gewählt. Bei den IF-Präparaten wurden pro Tier 30 Sphäroide vermessen.

### **Berechnung der Nebenachse der APPA4-positiven Sphäroide in den IF-Präparaten**

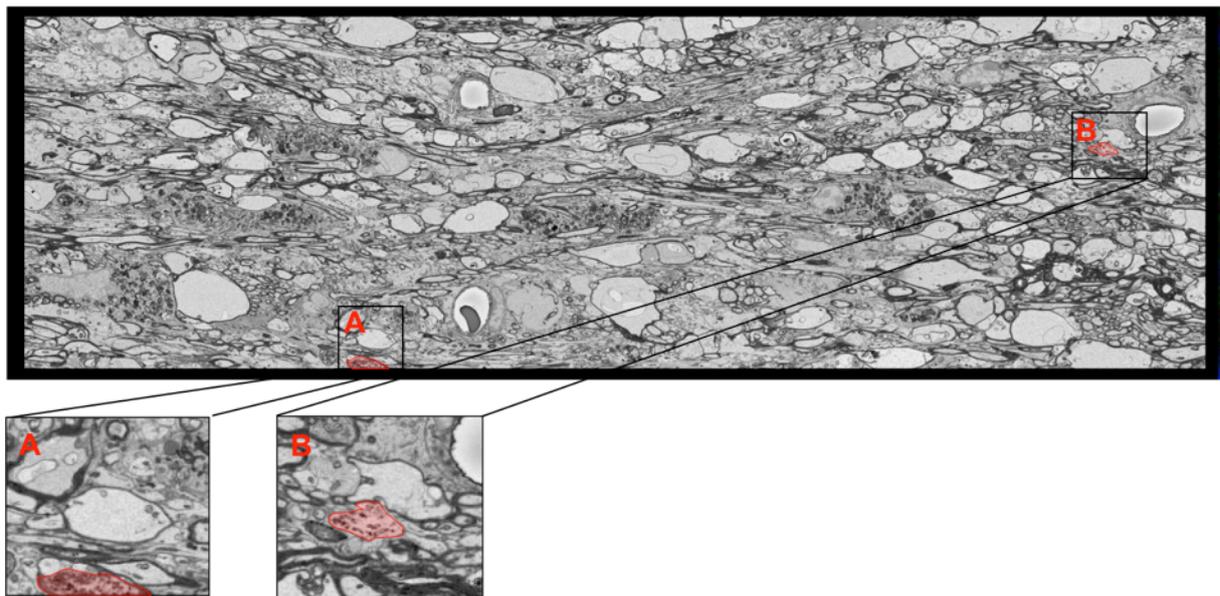
Pro Versuchstier wurden jeweils zwei Scans gewählt und pro Scan 15 randomisierte Sphäroide ausgemessen.

Hierfür wurde die Berechnung mit den Programmen Neurolucida360® und NeuroludicaExplorer® durchgeführt. Die jpx.-Datei der Scans wurde aufgerufen und das blaue DAPI-Signal ausgeblendet.

In dem 360°-Modus von Neurolucida360® wurden alle Somata detektiert und in der transparenten Ansicht nach korrekter Markierung überprüft, wie in Abbildung 14 beschrieben. Richtig markierte und nicht angeschnittene Sphäroide wurden notiert und die Markierung als DAT.-Datei gespeichert (siehe Abbildung 23).

Diese wurde mit NeurolucidaExplorer® geöffnet, und es wurde erneut überprüft, ob die ausgewählten Sphäroide den Kriterien entsprechen. Anschließend wurden die Nebenachsen über den Wert des größten „minimum feret“ tabellarisch notiert.

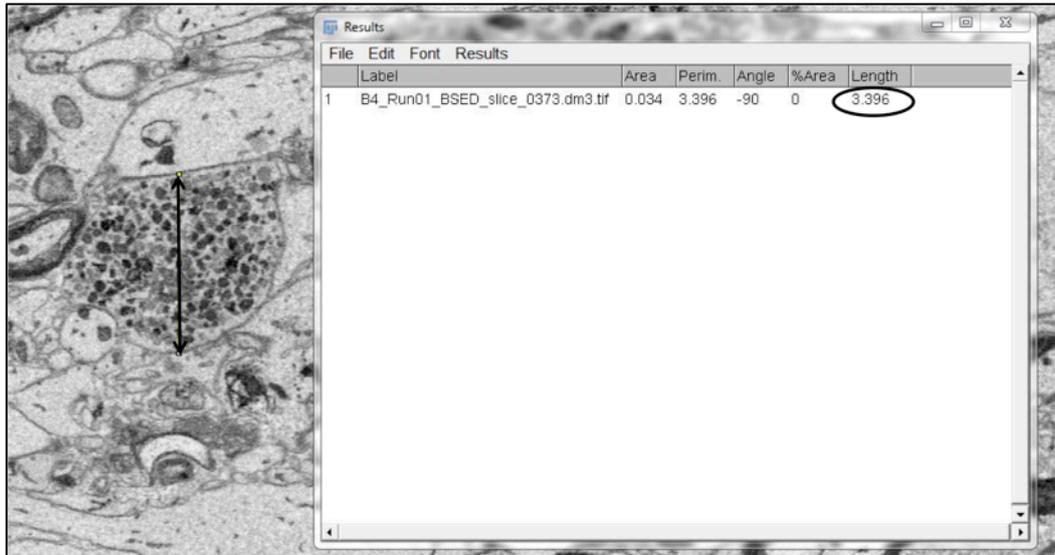
Im weiteren Verlauf wurden die Messwerte nach Häufigkeit pro Nebenachse gelistet. Hieraus ließ sich das Einschlusskriterium des maximalen Durchmessers generieren (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 23: Einschlusskriterium: vollständig erfasste Sphäroide**

(A): Beispiel angeschnittener Sphäroid

(B): Beispiel nicht-angeschnittener Sphäroid



**Abbildung 24: Messen der Nebenachse des Sphäroids mit ImageJ®**

### 3.2.5 Volumenberechnung der Sphäroide

Um eine Aussage über das Größenverhältnis zwischen den Sphäroiden in den IF-Präparaten und denen der EM-Daten treffen zu können, wurden die Volumina der Sphäroide beider Versuchsgruppen berechnet.

#### **Volumenberechnung der APPA4-positiven Sphäroide in den IF-Präparaten**

Es wurden die Volumina von 30 APPA4-positiven Sphäroiden pro Versuchstier berechnet. Hierbei wurden jeweils 15 Sphäroide aus der ersten und der zweiten ROI ausgewählt. Die Berechnung wurde mit den Programmen Neurolucida360® und NeuroludicaExplorer® durchgeführt.

Die jpx.-Datei des Scans wurde in Neurolucida360® aufgerufen und das blaue DAPI-Signal ausgeblendet. Im 360°-Modus wurden alle Somata detektiert und randomisiert für die Wertung ausgewählt. Hierbei wurden jedoch nur Sphäroide in die Wertung mit einbezogen, deren Nebenachse  $<1 \mu\text{m}$  betrug und die nicht angeschnitten waren. Die auf Korrektheit und Vollständigkeit überprüften Markierungen der ausgewählten Sphäroide wurden als DAT.-Datei gespeichert.

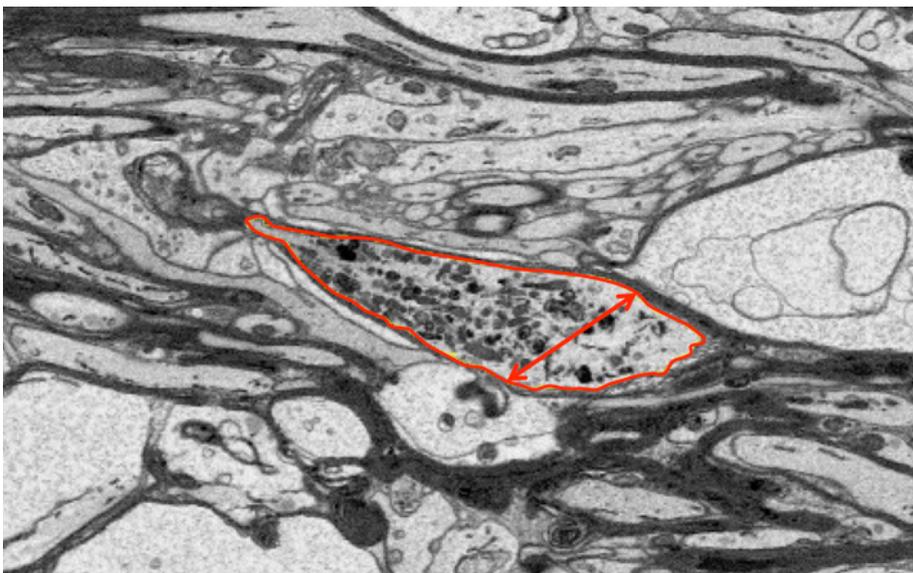
Die DAT.-Dateien wurden mit NeurolucidaExplorer® geöffnet und es wurde erneut überprüft, ob die ausgewählten Sphäroide den Kriterien entsprechen. Anschließend wurden die Volumina der Sphäroide („enclosed volume“) mit NeurolucidaExplorer® berechnet. Dies erfolgte durch die Addition aller markierten Flächeninhalte eines Sphäroids multipliziert mit der Schichtdicke der Aufnahmen.

Um die ausgemessenen APPA4-Sphäroide nach den Klassen I, II und III zu unterteilen, wurde bei jedem Sphäroid außerdem die Nebenachse der elliptoiden Körper berechnet.

### **Volumenberechnung der Sphäroide in den EM-Daten**

Aufgrund eines kleineren EM-Datensatzes im Vergleich zu den IF-Präparaten (TM269, TM270, TM271) konnten von jeweils zehn randomisierten Sphäroiden der Versuchstiere (Tier1, Tier2, Tier3, Tier4) die Volumina bestimmt werden. Es wurden nicht angeschnittene Sphäroide mit einer Nebenachse von  $<1 \mu\text{m}$  ausgewählt.

Zur Berechnung des Volumens wurde mithilfe eines elektronischen Eingabestiftes die Fläche der ausgewählten Sphäroide auf jeder Bilddatei markiert und der Flächeninhalt berechnet (siehe Abbildung 25). Außerdem wurde die Nebenachse ermittelt, um eine Einteilung in die Klassen I, II und III vorzunehmen (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 25: Volumen-Berechnung der Sphäroide in den EM-Daten mit ImageJ®**

Markierte Fläche eines randomisierten Sphäroids; Pfeil: Ermittlung der Nebenachse des selben Sphäroids zur Einteilung in eine der drei Klassen

Alle Flächenberechnungen der Sequenz eines Sphäroids wurden addiert und mit der Schichtdicke der Aufnahmen ( $0,08 \mu\text{m}$ ) multipliziert. So wurde das Volumen eines axonalen Sphäroids berechnet. Bei der Auswertung der Volumina wurde aufgrund eines Ausreißers eines der 20 Ergebnisse nicht in die Wertung mit einbezogen. Mit  $208,272 \mu\text{m}^3$  war der Wert 82,72 % größer als der nächstkleinere Wert.

### 3.2.6 Erstellung von Klassen anhand der Nebenachse der APPA4-positiven Sphäroide in den IF-Daten

Um einen noch spezifischeren Vergleich der Volumina der IF-Präparate und der EM-Daten zu erhalten, wurden durch die gewonnenen Messdaten drei Klassen definiert (siehe Tabelle 21). Diese Klassen wurden aufgrund der quantitativ umfangreicheren Datenlage und der Annahme, dass die IF-Präparate den unabhängigen Werten entsprechen, anhand der IF-Daten bestimmt und auf die EM-Daten angewendet.

Anhand dieser ließ sich außerdem vergleichen, ob die Quantität der Messangaben pro Klasse zwischen den EM- und den IF-Daten übereinstimmt oder ob große Abweichungen in der Größenverteilung vorliegen.

**Tabelle 21: Einteilung der Sphäroide in Klassen anhand der Nebenachse**

<b>Klasse I</b>	<b>Klasse II</b>	<b>Klasse III</b>
Nebenachse: 1-2 $\mu\text{m}$	Nebenachse: 2-3 $\mu\text{m}$	Nebenachse: 3-4 $\mu\text{m}$

### **Berechnung der Nebenachse der Sphäroide in den EM-Daten**

Nach korrekter Skalierung in ImageJ® wurden von jedem Versuchstier (B1, B2, B3, B4) bei jeweils zehn Sphäroide die Nebenachse gemessen. Hierbei wurde wie bei den Zellkernen verfahren, indem der Durchmesser in allen Scans gemessen wurde, die die jeweiligen Sphäroide darstellten, und anschließend der größte Wert festgehalten wurde. Auch hier wurde wieder darauf geachtet, dass nur vollständig abgebildete Sphäroide gemessen wurden (siehe Abbildung 23).

## 3.3 Untersuchung der Formen des akuten, axonalen Schadens

In einem nächsten Schritt wurden die unterschiedlichen Formen des akuten, axonalen Schadens untersucht. Es wurden dieselben zwei Datensätze wie beim Cuprizone-Tierversuch verwendet.

### 3.3.1 Analyse der Formen des axonalen Schadens anhand der IF-Daten

Um die gleiche Vorgehensweise wie bei den EM-Daten sicherzustellen, wurden zur Detektion der verschiedenen Formen der Sphäroide die konfokalen Scans in Neurolucida360® begutachtet.

Folgend werden ausschließlich die räumlichen Formen beschrieben, die in jedem Versuchstier sowie in allen Segmenten zwischen Region 265-295 zu finden waren.

Neben den genannten Formen waren noch weitere zu erkennen, welche aufgrund ihrer Unregelmäßigkeit in Anzahl und Raumstruktur nicht weiter erläutert werden.

### 3.3.2 Deskriptive Analyse der Formen des axonalen Schadens anhand der EM-Daten

Auch die EM-Daten der Versuchstiere wurden vollständig auf die verschiedenen Raumstrukturen der Sphäroide anhand von ImageJ® untersucht.

Die EM-Aufnahmen wurden auf die in den IF-Präparaten gesichteten Formen untersucht. Es wurden nur Formen der Sphäroide beschrieben, die in allen Versuchstieren der EM-Daten detektiert werden konnten.

Aufgrund der ultrastrukturellen Darstellung der EM-Sphäroide wurde die Myelinscheiden anhand erhöhter Elektronendicht des Myelins im Vergleich zum Axon erkennbar. Es ließen sich myelinisierte und nicht-myelinisierten Sphäroiden unterscheiden.

### 3.3.3 Dreidimensionale Rekonstruktion von Axonen der Versuchs- und Kontrolltiere aus den EM-Daten mit BioVis3D®

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Formen des akuten, axonalen Schadens auf ultrastruktureller Ebene und der räumlichen Betrachtung der Sphäroide wurden anhand der EM-Aufnahmen dreidimensionale Rekonstruktionen (3D-Rekonstruktion) der Sphäroide erstellt. Diese wurden mit dem Programm BioVis3D® angefertigt.

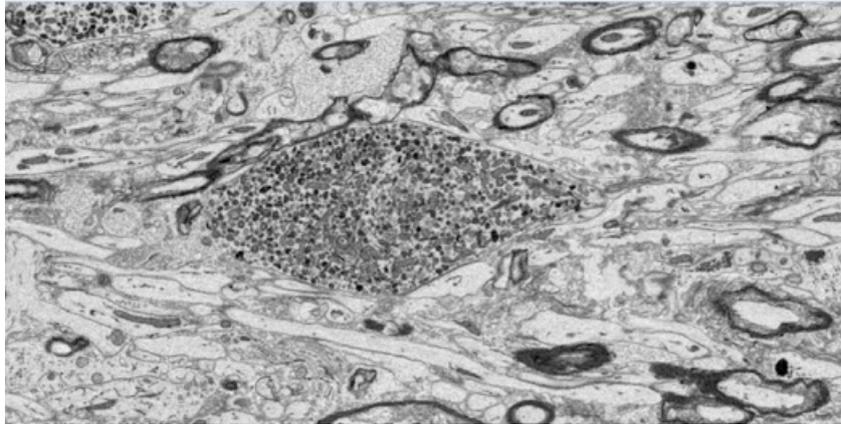
Rekonstruiert wurden zwei vollständige Axone aus zwei verschiedenen Kontrolltieren sowie drei axonale Auftreibungen der vier 0,25%-Cuprizone-behandelten Tiere.

Die Sequenz an EM-Aufnahmen, die ein vollständiges Sphäroid beinhaltet, wurde in der 25%-Auflösung in dem Programm BioVis3D® geöffnet. Für eine maßstabsgetreue Rekonstruktion wurden die von RenovoNeural® angegebenen Werte (Länge einer Datei: 204,54 µm, Breite einer Datei: 61,36 µm, Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen: 0,08 µm, Pixelgröße 0,1 µm in der X- und Y-Achse) berücksichtigt.

Für die Rekonstruktion eines Sphäroids wurde in jeder EM-Aufnahme der Sequenz die Fläche des Sphäroids markiert. Durch die Gesamtheit der markierten Flächen und den

Abstand zwischen zwei Aufnahmen erstellte das Programm ein dreidimensionales Modell des Axons.

Durch die verbesserte Auflösung des elektronenmikroskopischen Datensatzes lassen sich hierbei, anders als in den IF-Präparaten, ultrastrukturell bestimmte Zellorganellen detektieren. Hierzu zählen Mitochondrien und Vesikel innerhalb der Axone und degenerierte Zellorganell-Fragmente innerhalb der axonalen Auftreibungen, wie sie in Abbildung 26 zu sehen sind.



**Abbildung 26: Beispiel eines Sphäroids der EM-Daten mit erkennbaren Zellorganellen**

Ansammlung von fragmentierten Zellorganellen wie Mitochondrien und Vesikel

Es wurden vollständige, nicht fragmentierte Mitochondrien des Axons markiert. Dies erfolgte in der gleichen Vorgehensweise wie bei den Axonen.

Die dritte markierte Struktur innerhalb der Rekonstruktionen stellte die äußerste Lamelle der Myelinscheide dar. Somit ließ sich die abschnittsweise vorhandene Abspaltung der Myelinscheide von dem geschädigten Axon visualisieren.

### 3.4 Quantitative Analyse der degenerierten Axone pro Fläche

Es wurde die Anzahl der degenerierten Axone pro Fläche in den vier Versuchstieren B1, B2, B3 und B4 sowie in den vier Kontrolltieren C1, C2, C3 und C4 ermittelt.

Hierfür wurden die degenerierten Axone pro Scan ausgezählt. Jeder 20. Scan wurde in die Analyse einbezogen. Grund für eine unterschiedliche Anzahl an verwendeten Scans war die Gesamtzahl aller Scans pro Tier. Somit wurden bei dem Versuchstier B1 und B2 jeweils 27 Scans ausgewertet, bei B3 23 und bei B4 22. Bei den Kontrolltieren wurden bei Tier C1 28 Scans analysiert und bei den Tieren C2, C3 und C4 jeweils 24.

Als Einschlusskriterien galten alle vollständig erfassten, degenerierten Axone sowie degenerierte Axone, die an der rechten und unteren Seite des Scans angeschnitten waren. Axone, die an der linken und unteren Seite des Scans angeschnitten waren, wurden nicht in die Zählung aufgenommen (siehe Abbildung 23).

Ein Axon galt als degeneriert, sobald ein Axon nicht mehr myelinisiert war und/oder nur fragmentierte Zellorganellen zu erkennen waren (siehe Abbildung 27), sowie leere Myelinlamellen, die keinen axonalen Inhalt zeigten. Die Myelinlamellen waren als elektronendichte, schwarz imponierende, rundliche Umrandung der Somata zu identifizieren.

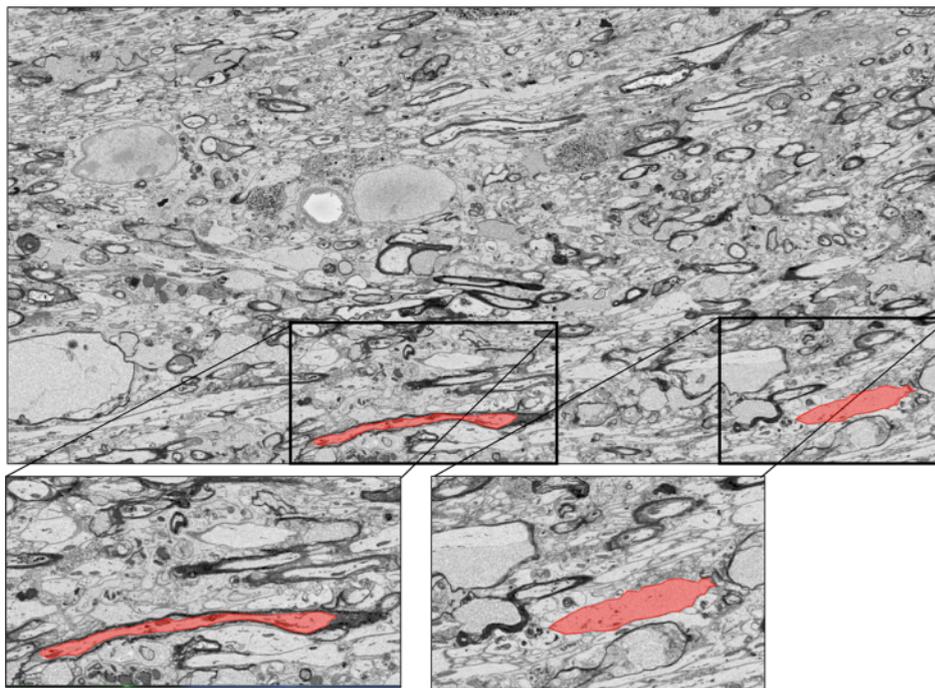


Abbildung 27: Unterscheidung von degenerierten und gesund erscheinenden Axonen

**(A):** Beispiel eines gesund erscheinenden Axons: Zellorganellen wie zum Bsp. Mitochondrien sichtbar

**(B):** Beispiel eines degenerierten Axons: keine intakte Zellorganellen erkennbar

### 3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sowie die Anfertigung von Graphen erfolgten mit dem Programm GraphPad 5. Mit dem D'Agostino-Test wurden die Werte auf Normalverteilung überprüft. Parametrische Daten wurden mit dem T-Test auf statistische Signifikanz überprüft, nicht-parametrische Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Hierbei sind \*  $p \leq .005$ , \*\* $p \leq .001$  und \*\*\* $p \leq .0001$  signifikant.

## 4. Ergebnisse

Im Rahmen der MS-Forschung wird oftmals auf experimentelle Untersuchungsmethoden in Form von Tiermodellen zurückgegriffen. Diese simulieren unterschiedliche Teilaspekte der Erkrankung. Für diese Arbeit wurde das oft angewandte, toxische Cuprizone-Modell genutzt. Das Modell eignet sich um De- und Remyelinisierungsprozesse bei der MS zu erforschen.

Untersucht wurde der, durch das Cuprizone-Modell induzierte, akute, axonale Schaden im CC. Der akute, axonale Schaden zeigt sich unter anderem durch Sphäroide entlang der geschädigten Axone. In der Analyse dieser Sphäroide wird ein wichtiger Ansatz zur Entschlüsselung ungelöster Aspekte des akuten, axonalen Schadens, und somit der Ursache der MS, vermutet.

Die Sphäroide lassen sich mit unterschiedlichen Methoden untersuchen. Zwei dieser Methoden, die immunhistochemische und die elektronenmikroskopische, wurden bei dieser Arbeit angewandt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Dabei lag der Fokus auf dem dreidimensionalen Vergleich dieser Aspekte:

1. Die Volumina der Sphäroide
2. Die Analyse der räumlichen Formen der Sphäroide
3. Die Quantität degenerierter Axone pro Untersuchungsfläche.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Aspekte des akuten, axonalen Schadens in den IF- und EM-Daten gezeigt und die Datensätze miteinander verglichen.

### 4.1 Die Volumina der Sphäroide in den IF- und EM-Daten

Die Volumina der IF- und EM-Sphäroide wurden verglichen, um festzustellen, ob der akute, axonale Schaden in beiden Datensätzen ähnliche, räumliche Größen annimmt.

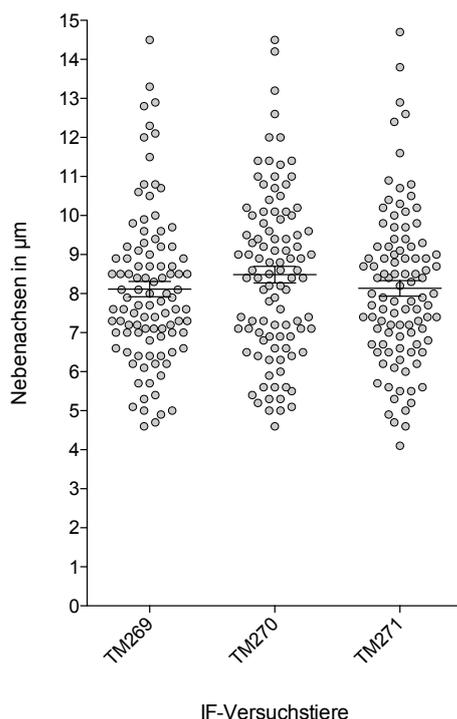
Um dies zu untersuchen, mussten eventuelle Volumenveränderungen durch die unterschiedliche Gewebeverarbeitungen statistisch bereinigt werden. Im Folgenden wurde dies durch die Erstellung eines Umrechnungsfaktors durchgeführt.

#### 4.1.1 Die Einbettung mit Kryo und Kunstharz resultiert in Volumenveränderungen der Sphäroide

Da davon ausgegangen wurde, dass die Zellkerne der Präparate weder schwellen noch schrumpfen wurde ein Umrechnungsfaktor auf der Grundlage der Zellkernachsen etabliert. Die Nebenachsen der elliptoiden Zellkerne der IF- und EM-Daten wurden vermessen und durch Division der Mittelwerte der Faktor errechnet (siehe Abbildung 28).

Es wurden 100 randomisierte Zellkerne der IF-Präparate pro Versuchstier gemessen. Diese ergaben nicht normalverteilte Werte mit einem Gesamt-Mittelwert von  $8,25 \mu\text{m} \pm 1,95 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ). Die mittleren Messwerte der einzelnen Tiere ergaben sehr ähnliche Ergebnisse (Tier 1:  $8,12 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$ , Tier 2  $8,49 \mu\text{m} \pm 2,1 \mu\text{m}$ ; Tier 3:  $8,14 \mu\text{m} \pm 1,8 \mu\text{m}$ ). Die Standardabweichung von  $1,95 \mu\text{m}$  zeigte eine geringe Streuung der Messwerte. Ausreißer waren bei den Daten nicht vorhanden. Die Spannweite betrug  $10,6 \mu\text{m}$  mit dem Minimalwert von  $4,1 \mu\text{m}$  und dem Maximalwert von  $14,7 \mu\text{m}$  (siehe Abbildung 28).

Die Nebenachsen der Zellkerne in den IF-Präparaten in  $\mu\text{m}$

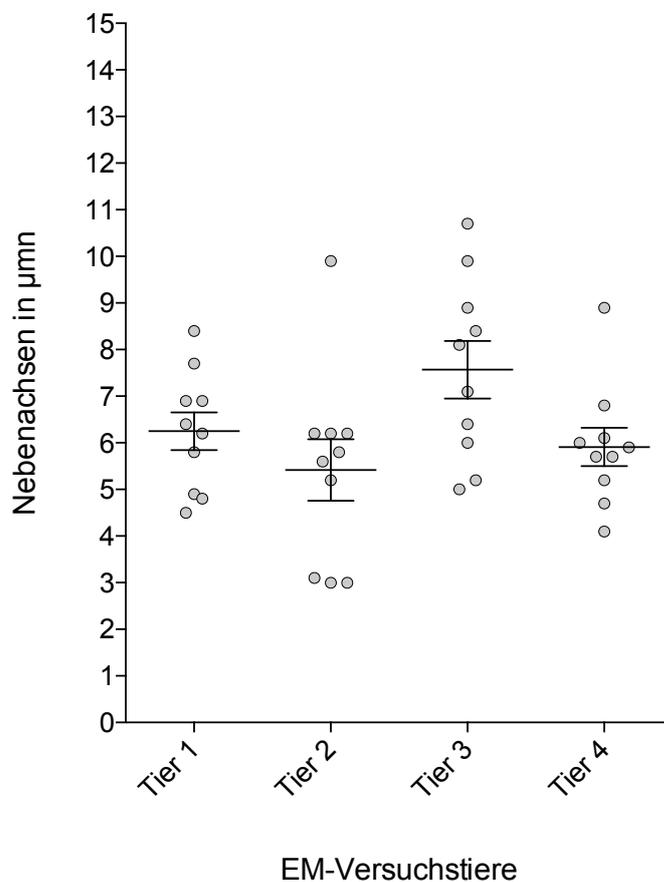


**Abbildung 28: Die Nebenachse Zellkerne in den IF-Präparaten**

Abbildung 28 zeigt die Messdaten aller drei Versuchstiere TM 269, TM 270 und TM 271 des 3-Wochen Cuprizone-Versuchs in  $\mu\text{m}$ . Die Werte waren nicht normalverteilt (D'Agostino-Test: TM 269: Nein\*\*, TM 270: Nein\*\*, TM 271: Nein). Für alle 300 gemessenen Zellkerne ergab der Mittelwert  $8,25 \mu\text{m} \pm 1,95 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ). Der Mittelwert der Nebenachse lag für TM 269 bei  $8,12 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$ , für TM 270 bei  $8,49 \mu\text{m} \pm 2,1 \mu\text{m}$  und für TM 271 bei  $8,14 \mu\text{m} \pm 1,8 \mu\text{m}$ .

Anschließend wurden die Nebenachsen der Zellkerne der EM-Daten anhand von 10 Exemplaren pro Tier erhoben. Auch diese waren nicht normalverteilt. Die Nebenachsen der EM-Kerne ergaben einen Gesamt-Mittelwert von  $6,3 \mu\text{m} \pm 1,9 \mu\text{m}$  ( $n=4$ ). Dieser resultierte aus den Mittelwerten der Daten der einzelnen Versuchstiere (Tier 1  $6,3 \mu\text{m} \pm 1,2 \mu\text{m}$ ; Tier 2  $5,4 \mu\text{m} \pm 2,1 \mu\text{m}$ ; Tier 3  $7,6 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$ ; Tier 4  $5,9 \mu\text{m} \pm 1,3 \mu\text{m}$ ). Die Spannweite betrug  $7,7 \mu\text{m}$  und resultierte aus dem Minimalwert von  $3,0 \mu\text{m}$  und dem Maximalwert von  $10,7 \mu\text{m}$ . Ausreißer waren auch hier nicht vorhanden (siehe Abbildung 29).

### Die Nebenachsen der Zellkerne in den EM-Daten in $\mu\text{m}$



**Abbildung 29: Die Nebenachse der Zellkerne in den EM-Daten**

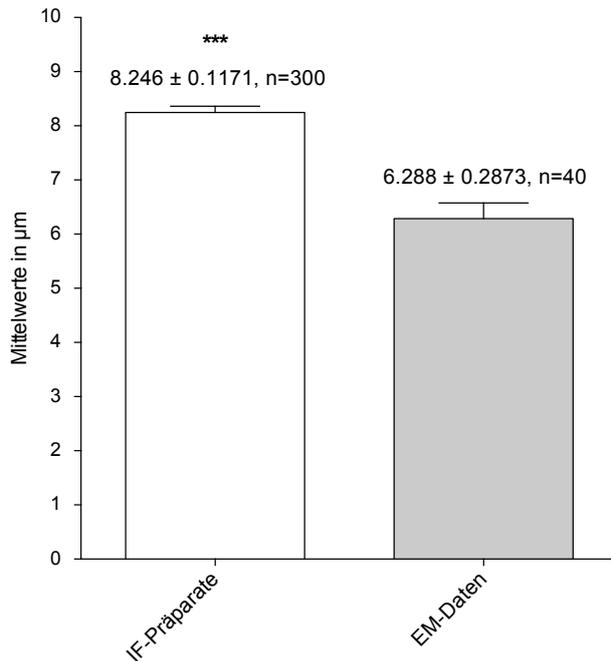
Abbildung 29 zeigt die Messdaten der vier Versuchstiere B1-B4 des 3-Wochen Cuprizone-Versuchs in  $\mu\text{m}$ . Die Werte waren nicht normalverteilt (D'Agostino-Test: Tier 1: Ja, Tier 2: Ja, Tier 3: Ja, Tier 4: Nein\*). Der Mittelwert für alle 40 gemessenen Zellkerne ergab  $6,3 \mu\text{m} \pm 1,9 \mu\text{m}$  ( $n=4$ ). Die Mittelwerte der Nebenachsen einzelner Tiere ergaben  $6,3 \mu\text{m} \pm 1,2 \mu\text{m}$  für Tier 1;  $5,4 \mu\text{m} \pm 2,1 \mu\text{m}$  für Tier 2;  $7,6 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$  für Tier 3 und  $5,9 \mu\text{m} \pm 1,3 \mu\text{m}$  für Tier 4.

Die Mittelwerte der IF-Präparate und der EM-Daten wurden miteinander verglichen (Abbildung 30). Aufgrund der nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, um die zwei Vergleichsgruppen bezüglich ihrer Mittelwerte zu vergleichen.

Da der Mann-Whitney U-Test mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,0001$  ausfiel, wurden deutliche Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen ersichtlich, während die Versuchstiere innerhalb einer Gruppe sehr homogene Werte mit geringen Standardabweichungen zeigten. Der Standardfehler der IF-Daten lag bei  $0,1 \mu\text{m}$ , während der Standardfehler der EM-Daten bei  $0,3 \mu\text{m}$  lag. Der Mittelwert der EM-Daten lag im Mittel ein Drittel unter dem der IF-Daten (vergleiche IF= $8,25 \mu\text{m}$ ; EM= $6,3 \mu\text{m}$ ). Auch die Standardabweichung der EM-Daten war kleiner als die der vergleichenden IF-Daten (vergleiche IF= $1,95 \mu\text{m}$ ; EM= $1,6 \mu\text{m}$ ). Die Spannweite der EM-Messpunkte lag bei  $7,7 \mu\text{m}$  und war auch kleiner als die der IF-Daten mit einer Spannweite von  $10,6 \mu\text{m}$ . Somit war bei gleichen Versuchsbedingungen von einer Volumenveränderung des Untersuchungsmaterials während der Einbettung auszugehen. Die Grafik veranschaulicht daher, dass ein Umrechnungsfaktor zur Vergleichbarkeit der Datensätze notwendig war.

Zur Generierung eines Umrechnungsfaktors wurde der Mittelwert der IF-Daten durch den Mittelwert der EM-Daten dividiert. Die Division ergab den Umrechnungsfaktor von 1,3. Somit wurden die EM-Daten mit dem Faktor 1,3 multipliziert, um Größenunterschiede der Sphäroide durch die Prozessierung auszuschließen.

Der Vergleich der Mittelwerte der Nebenachsen der Zellkerne  
in den IF-Präparaten und den EM-Daten in  $\mu\text{m}$



**Abbildung 30: Vergleich der Nebenachsen der Zellkerne in den IF-Präparaten und den EM-Daten in  $\mu\text{m}$**

Abbildung 30 zeigt den Vergleich der Nebenachsen der Zellkerne in den IF- und EM-Daten in  $\mu\text{m}$ . Der Standardfehler betrug bei allen Messgrößen der IF-Präparate  $0,1 \mu\text{m}$  ( $n=300$ ) und bei allen Werten der EM-Daten  $0,3 \mu\text{m}$  ( $n=40$ ). IF-Präparate=300, EM-Daten=40; Auswertung: Mann-Whitney-U IF-Präparate gegen EM-Daten. \*\*\*  $p \leq .001$ .

Um den Vergleich der sphäroidalen Volumina zu präzisieren, wurden Einschlusskriterien definiert. Neben bereits genannten Einschlusskriterien (siehe 3.2.4) wurde im Folgenden das Kriterium einer definierten Nebenachse der Sphäroide festgelegt.

#### 4.1.2 Die Mehrheit der Sphäroide weisen eine Nebenachse von 1 bis $4 \mu\text{m}$ auf

Eine definierte Nebenachse diente als Einschlusskriterium der Sphäroide, um stochastische Ausreißer zu bereinigen. Die Nebenachse wurde hier als Kriterium gewählt, da sie weniger starken Größenschwankungen ausgesetzt war als die Hauptachse. Die Analyse der häufigsten Nebenachsen wurde anhand der IF-Präparate durchgeführt.

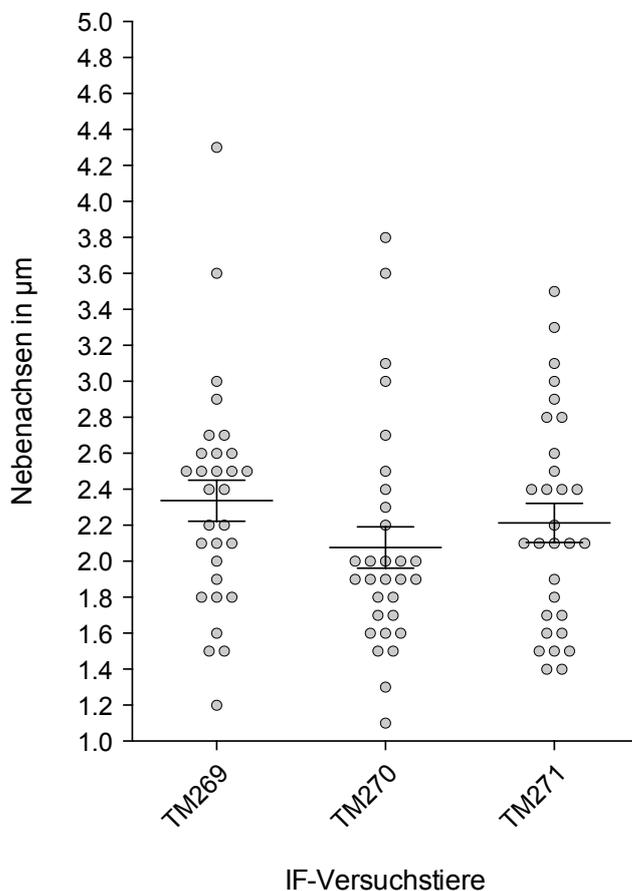
Pro Versuchstier wurde an 30 randomisierten Sphäroiden die Nebenachse gemessen. Die Werte waren laut D'Agostino-Test nicht normalverteilt, der Mittelwert aller Messdaten lag bei  $2,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ). Auch diese drei Messwerte waren sich sehr ähnlich (Tier 269:  $2,3 \mu\text{m}$

$\pm 0,6 \mu\text{m}$ ; Tier 270:  $2,1 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ ; Tier 271:  $2,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ ). Die Standardabweichung war mit  $0,6 \mu\text{m}$  bei allen drei Tieren sehr gering. Ausreißer lagen nicht vor. Die Spannweite lag bei  $3,3 \mu\text{m}$ , der Minimalwert bei  $1,1 \mu\text{m}$  und der Maximalwert bei  $4,4 \mu\text{m}$ .

Die Messdaten oberhalb der jeweiligen Mittelwerte waren stärker gestreut und heterogener als unterhalb der Mittelwerte. Die Anzahl an kleineren Durchmessern als die Mittelwerte war größer als die der höheren Werte. Diese Tendenz zeigte sich bei allen drei Versuchstieren.

Abbildung 31 zeigt die Messungen Nebenachse der 30 APPA4-positiven Sphäroide pro Versuchstier.

Die Nebenachsen der Sphäroide in den IF-Präparaten in  $\mu\text{m}$



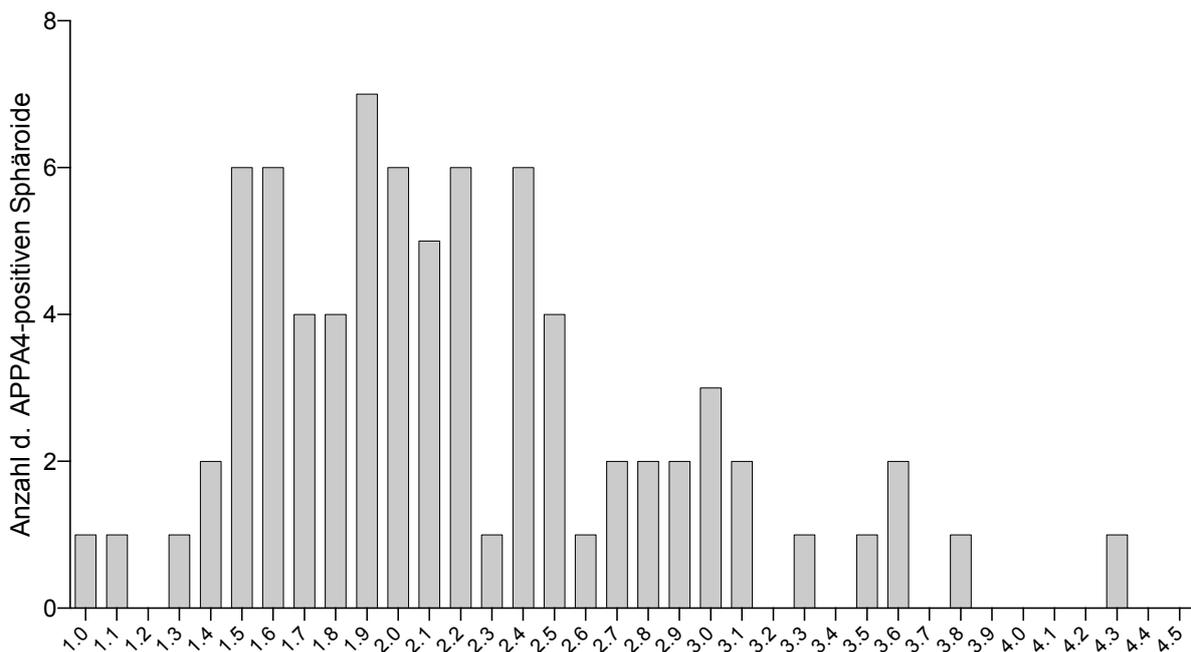
**Abbildung 31: Die Nebenachse der APPA4-positiven Sphäroide der IF-Präparate**

Abbildung 31 zeigt die Messdaten aller drei Versuchstiere TM 269, TM 270 und TM 271 des 3-Wochen Cuprizone-Versuchs in  $\mu\text{m}$ . Die Werte waren nicht normalverteilt (D'Agostino-Test: TM 269: Nein\*\*, TM 270: Nein\*\*, TM 271: Ja). Der Mittelwert aller 90 Messungen ergab  $2,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ). Der Mittelwert Nebenachse betrug bei TM 260  $2,3 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ , bei TM 270  $2,1 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$  und bei TM 271  $2,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ .

Die Messdaten wurden schließlich nach ihrer Nebenachse in die Größenklassen eingeteilt (siehe Abbildung 32). Hierbei wurden die Messwerte in  $0,1 \mu\text{m}$ -Abständen differenziert.

Der Abbildung 32 lässt sich entnehmen, dass der häufigste Messwert der Nebenachsen 1,9  $\mu\text{m}$  betrug. Die meisten Messungen nahmen Werte zwischen 1,5  $\mu\text{m}$  und 2,5  $\mu\text{m}$  an. Aufgrund dieser Verteilung der Messdaten wurden das Einschlusskriterium einer Nebenachse von mindestens 1  $\mu\text{m}$  und maximal 4  $\mu\text{m}$  definiert. Die Auswahl der Sphäroide in den EM-Daten erfolgte nach Anwendung des Umrechnungsfaktors.

Die Nebenachsen der APPA4-positiven Späroide in den IF-Präparaten in  $\mu\text{m}$



Die Nebenachsen der APPA4-positiven Späroide in den IF-Präparaten in  $\mu\text{m}$

**Abbildung 32: Quantitative Verteilung der Werte der Nebenachse der APPA4-positiven Sphäroide in den IF-Präparaten**

Mit dem nun vorhandenen Umrechnungsfaktor und dem definierten Einschlusskriteriums der Nebenachse von 1  $\mu\text{m}$  bis 4  $\mu\text{m}$ , konnten im Folgenden die Volumina der beiden Datensätze ermittelt werden.

#### 4.1.3 Die Vergleichsgruppen weisen unterschiedliche Volumina auf

Die Volumina der IF- und der EM-Daten wurden berechnet und ihr Mittelwert verglichen, um somit die Arbeitshypothese (siehe Seite 22) zu prüfen. Es sollte geklärt werden, ob

Sphäroide aus Gewebe desselben Cuprizone-Modells in IF- und EM-Daten dreidimensional ähnliche Ergebnisse liefern.

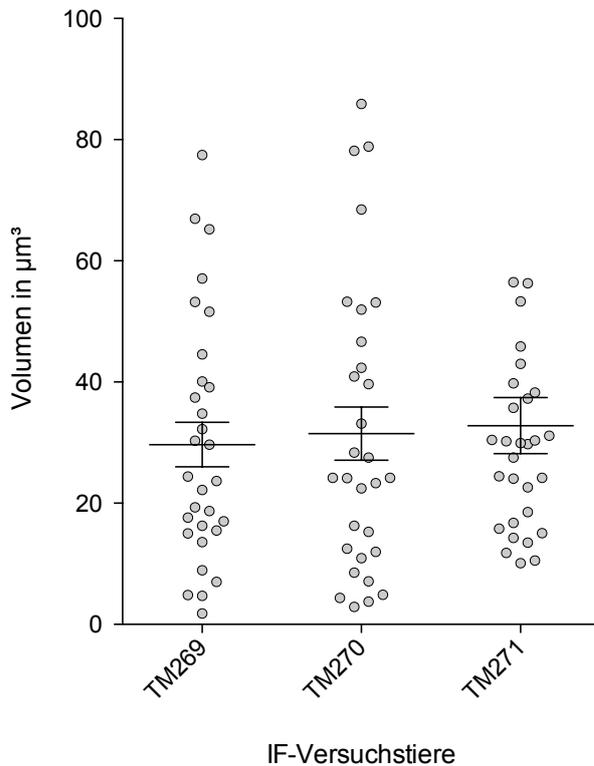
Es wurden die Volumina von jeweils 30 Sphäroiden pro Versuchstier der IF-Präparate vermessen (siehe Abbildung 33). Die erhobenen Daten waren laut D'Agostino-Test nicht normalverteilt, der Mittelwert lag bei  $31,2 \mu\text{m}^3 \pm 23,2 \mu\text{m}^3$  (n=3). Er resultierte aus Mittelwerten, die sehr ähnliche Werte zwischen den einzelnen Versuchstieren annahmen, mit  $29,7 \mu\text{m}^3 \pm 20,1 \mu\text{m}^3$  (Tier 269),  $31,5 \mu\text{m}^3 \pm 24,0 \mu\text{m}^3$  (Tier 270) und  $32,8 \mu\text{m}^3 \pm 25,3 \mu\text{m}^3$  (Tier 271).

Verglichen mit den mittleren Werten der Nebenachse unterlagen auch die Volumina oberhalb der Mittelwerte einer größeren Streuung mit heterogenerer Verteilung der Daten als unterhalb des Mittelwertes. Die Anzahl an Volumina kleiner als der Mittelwert war auch hier erheblich größer als die der Volumina  $> 31,2 \mu\text{m}^3$ .

Der Minimalwert der gemessenen Volumina lag bei  $1,81 \mu\text{m}^3$ , der Maximalwert bei  $85,90 \mu\text{m}^3$ . Damit lag eine Spannweite der Volumina von  $84,01 \mu\text{m}^3$  vor.

Die Messdaten von Tier 271 zeigten einen Ausreißer mit einem Volumen von  $147,22 \mu\text{m}^3$ . Dieser wurde in Abbildung 33 ausgeschlossen. Bei integriertem Ausreißer betrüge der Mittelwert von Tier 271  $32,8 \mu\text{m}^3$  und die Standardabweichung  $25,4 \mu\text{m}^3$ .

## Das Volumen der Sphäroide in den IF-Präparaten in $\mu\text{m}^3$



### Abbildung 33: Volumen der APPA4-positiven Sphäroide in den IF-Präparaten pro Versuchstier

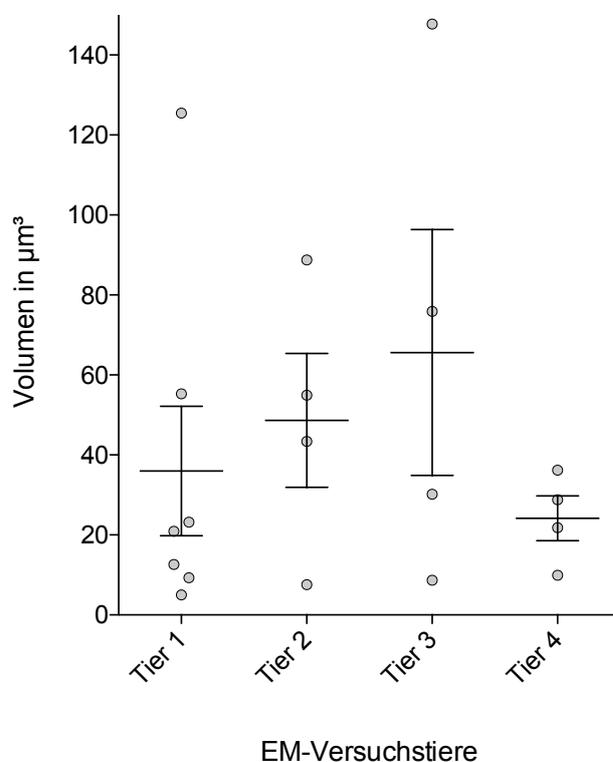
Abbildung 33 zeigt die APPA4-positiven Sphäroide der IF-Präparate. Die Werte waren nicht normalverteilt (D'Agostino-Test: TM 269: Ja, TM 270: Ja, TM 271: Ja\*\*\*\*). Der Mittelwert aller Werte betrug  $31,2 \mu\text{m}^3 \pm 23,2 \mu\text{m}^3$  ( $n=3$ ). Der Mittelwert der Volumina betrug bei TM 269  $29,7 \mu\text{m}^3 \pm 20,1 \mu\text{m}^3$ , bei TM 270  $31,5 \mu\text{m}^3 \pm 24,0 \mu\text{m}^3$  und bei TM 271  $32,8 \mu\text{m}^3 \pm 25,3 \mu\text{m}^3$ .

In einem nächsten Schritt wurden die Volumina von 20 EM-Sphäroiden berechnet. Abbildung 34 zeigt dies. Aufgrund des begrenzten Datensatzes konnten nicht gleich viele sphäroide Volumina pro Tier bestimmt werden. In Tier 1 wurden sieben Sphäroide berechnet, in Tier 2 und Tier 3 vier und in Tier 4 fünf. Die Mittelwerte der Volumina der EM-Daten waren laut D'Agostino-Test nicht normalverteilt und divergierten untereinander wesentlich stärker als die der IF-Präparate (vergleiche:  $24,2 \mu\text{m}^3$  (Tier 4) und  $65,6 \mu\text{m}^3$  (Tier 3), siehe Abbildung 34). Der Mittelwert aller Versuchstiere lag bei  $43,6 \mu\text{m}^3 \pm 37,2 \mu\text{m}^3$  ( $M=4$ ).

Die einzelnen Mittelwerte der Tiere betragen  $36,0 \mu\text{m}^3 \pm 42,8 \mu\text{m}^3$  (Tier 1);  $48,7 \mu\text{m}^3 \pm 33,5 \mu\text{m}^3$  (Tier 2);  $65,6 \mu\text{m}^3 \pm 61,5 \mu\text{m}^3$  (Tier 3) und  $24,2 \mu\text{m}^3 \pm 11,2 \mu\text{m}^3$  (Tier 4). Die Spannweite betrug  $142,7 \mu\text{m}^3$  mit einem Minimum von  $5,1 \mu\text{m}^3$  und einem Maximum von  $147,7 \mu\text{m}^3$ . Damit war die Spannweite über ein Drittel größer als die der IF-Werte (vergleiche: IF=  $84,1 \mu\text{m}^3$ ).

Tier 4 hatte mit einem Volumen von  $270,75 \mu\text{m}^3$  einen ausreißenden Wert, der in der Abbildung 34 ausgeschlossen wurde. Integriert in die Ergebnisse von Tier 4 ergäben sich ein Mittelwert von  $73,50 \mu\text{m}^3$  und eine Standardabweichung von  $110,7 \mu\text{m}^3$ .

Das Volumen der Sphäroide in den EM-Daten in  $\mu\text{m}^3$



**Abbildung 34: Volumen der Sphäroide in den EM-Daten pro Tier**

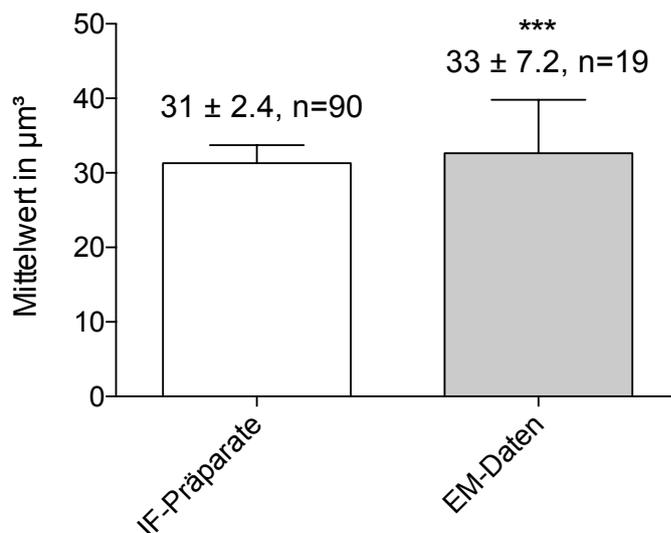
Abbildung 34 zeigt die Volumina der EM-Sphäroide pro Tier. Die Volumina waren nicht normalverteilt (D'Agostino-Test); Tier1: Nein, Tier2: Nein, Tier3: Nein, Tier4: Nein). Der Mittelwert der 19 Volumina lag bei  $43,6 \mu\text{m}^3 \pm 37,2 \mu\text{m}^3$  (N=4). Dieser resultierte aus den Mittelwerten der einzelnen Versuchstiere: Tier1:  $35,9 \mu\text{m}^3 \pm 42,8 \mu\text{m}^3$ ; Tier2:  $48,7 \mu\text{m}^3 \pm 33,6 \mu\text{m}^3$ ; Tier3:  $65,6 \mu\text{m}^3 \pm 61,5 \mu\text{m}^3$ ; Tier4:  $24,2 \mu\text{m}^3 \pm 11,2 \mu\text{m}^3$

In einem nächsten Schritt wurden die erhobenen Volumina miteinander verglichen.

## Vergleich der Volumina der IF- und EM-Daten

Abbildung 35 zeigt die Mittelwerte der IF- und der EM-Volumina. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte eine Signifikanz von  $p \leq 0,0001$ . Es existierten damit signifikante Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Der Standardfehler der IF-Daten lag bei  $2,4 \mu\text{m}^3$ , während der Standardfehler der EM-Daten bei  $7,2 \mu\text{m}^3$  lag. Der Mittelwert der IF-Präparate ( $31,2 \mu\text{m}^3$ ) war circa ein Drittel kleiner als der Mittelwert der EM-Daten ( $33,6 \mu\text{m}^3$ ). Dies stellte sich als signifikanter Unterschied dar. Auch die Standardabweichung war mit  $37,2 \mu\text{m}^3$  bei den EM-Daten weitaus höher als bei den IF-Daten ( $23,2 \mu\text{m}^3$ ). Hierbei fiel auf, dass die Differenz der beiden Mittelwerte nahezu den angewandten Umrechnungsfaktor darstellte.

### Der Vergleich der Mittelwerte der Volumina in den IF-Präparaten und den EM-Daten in $\mu\text{m}^3$



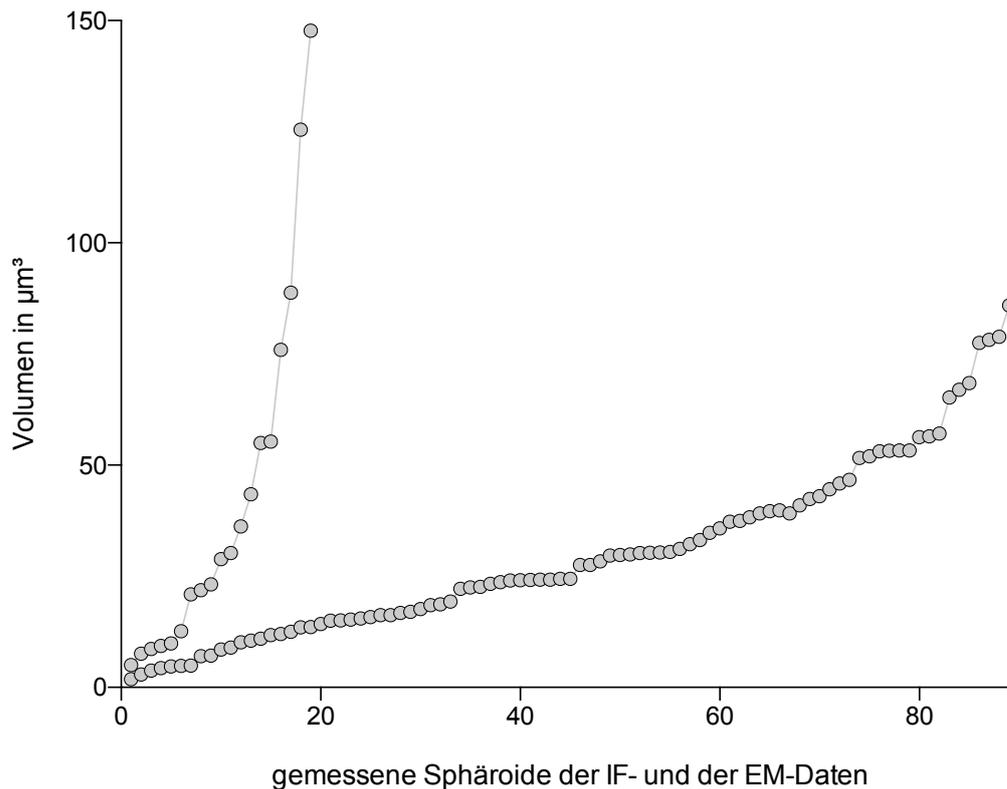
### Abbildung 35: Vergleich der Mittelwerte der Volumina der Sphäroide in den IF-Präparaten und den EM-Daten

Abbildung 35 zeigt den Mittelwert der Volumina der IF- und EM-Sphäroide. Der Standardfehler betrug bei den Volumina der IF-Präparate  $2,5 \mu\text{m}^3$  ( $n=90$ ) und bei den EM-Daten  $12,9 \mu\text{m}^3$  ( $n=19$ ). Auswertung: Mann-Whitney-U IF-Präparate gegen EM-Daten; \*\*\*  $p \leq .001$ .

Anschließend folgten weitere Analysen dieser Ergebnisse. Um neben dem Vergleich der Mittelwerte der Volumina auch die Gesamtheit aller gemessenen EM- und IF-Volumina zu betrachten, wurden alle Messwerte der Vergleichsgruppen in einer weiteren Grafik visualisiert (siehe Abbildung 36). Hier wird erkenntlich, dass die Messdaten ähnliche

Minimal- und Maximalwerte annahmen (Minimalwert der IF-Volumina: 1,81  $\mu\text{m}$ ; Minimalwert der EM-Volumina: 5,03  $\mu\text{m}$ ; Maximalwert der IF-Volumina: 147,22  $\mu\text{m}$ ; Maximalwert der EM-Volumina: 147,72  $\mu\text{m}$ ), die Verteilung der Werte jedoch erhebliche Unterschiede aufwies. Beide Datensätze zeigten eine Konzentrierung der Werte im unteren Drittel (X-Achse: 0-50  $\mu\text{m}$ ).

Der Vergleich der Volumina der Sphäroide in den IF-Präparaten und den EM-Daten



**Abbildung 36: Vergleich der Volumina der Sphäroide in den IF-Präparaten und den EM-Daten**

Nachdem alle Volumina berechnet und die Mittelwerte verglichen wurden, erfolgte ein Vergleich pro Größenklasse.

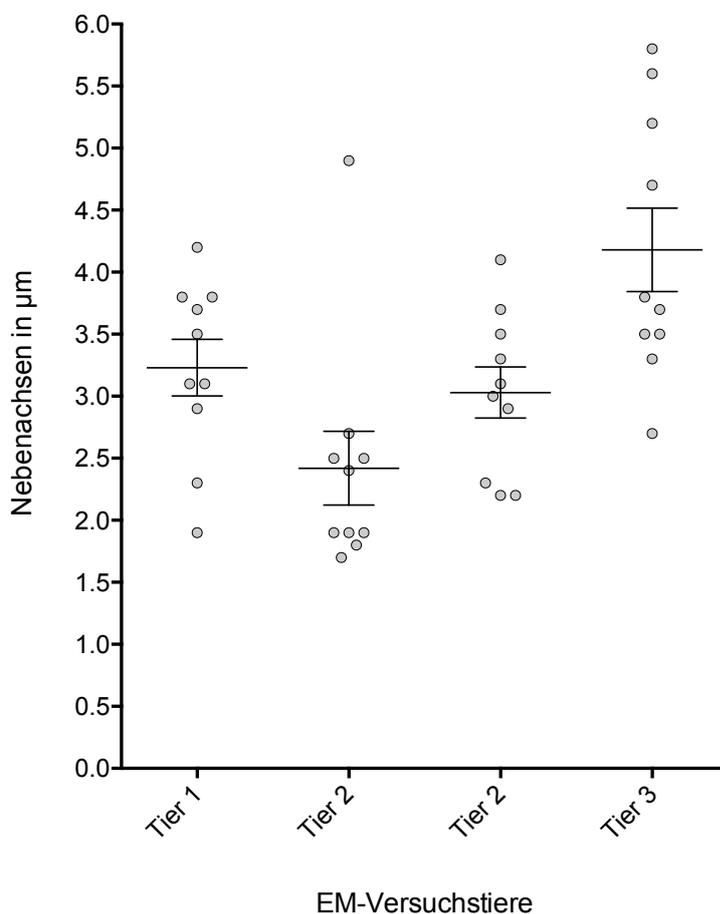
#### 4.1.4 Die Vergleichsgruppen weisen unterschiedliche Klassenstärken auf

Um die Volumina der Sphäroide beider Gruppen noch präziser vergleichen zu können, wurden drei Größenklassen gleicher Nebenachsen erstellt. Somit ließen sich die Klassen der IF- und EM-Präparate quantitativ genauer vergleichen. Außerdem konnte untersucht werden, inwiefern von der Nebenachse der Sphäroide auf das Volumen geschlossen werden kann (siehe Tabelle 21).

Für die Gruppenanalyse wurden zehn randomisierte EM-Sphäroide pro Versuchstier bezüglich der Nebenachse gemessen und in Abbildung 37 dargestellt. Die aufgelisteten Daten wurden bereits mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert.

Die Werte der Versuchstiere Tier 1, Tier 3 und Tier 4 waren laut D'Agostino-Test normalverteilt, die von Tier 2 nicht. Der Mittelwert aller Messdaten lag bei  $3,2 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$  ( $n=4$ ). Dieser resultierte aus den Messdaten der einzelnen Tiere (Tier 1:  $3,2 \mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$ ; Tier 2:  $2,4 \mu\text{m} \pm 0,9 \mu\text{m}$ ; Tier 3:  $3,0 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ ; Tier 4:  $4,2 \mu\text{m} \pm 1,1 \mu\text{m}$ ). Die Spannweite betrug  $3,6 \mu\text{m}$  mit einem Minimum von  $1,9 \mu\text{m}$  und einem Maximum von  $5,6 \mu\text{m}$ . Ausreißer lagen nicht vor.

Die Nebenachsen der Sphäroide in den Em-Daten in  $\mu\text{m}$



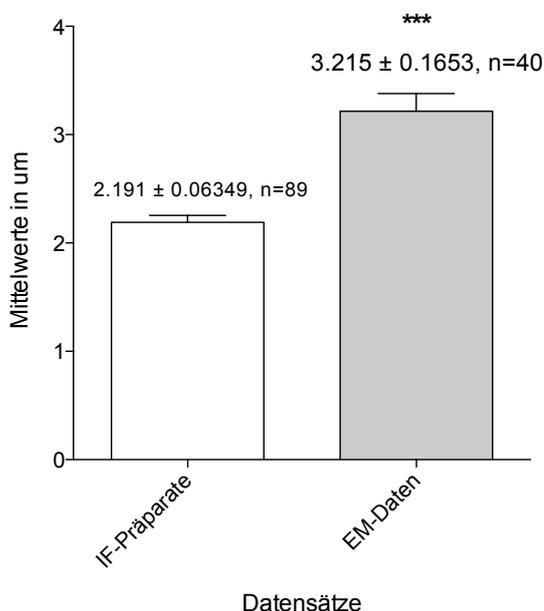
**Abbildung 37: Die Nebenachse Sphäroide der EM-Daten**

Abbildung 37 zeigt die Messdaten der vier Versuchstiere B1-B4 des 3-Wochen Cuprizone-Versuchs in  $\mu\text{m}$ . Die Werte waren nicht normalverteilt (D'Agostino-Test: Tier1: Ja, Tier2: Nein\*\*\*\*, Tier3: Ja, Tier4: Ja). Die 40 Messwerte zusammen ergaben einen Mittelwert von  $3,2 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$  ( $n=4$ ). Die EM-Daten ergaben folgende Mittelwerte der Nebenachse pro Versuchstier:  $3,2 \mu\text{m}$  für Tier1,  $2,4 \mu\text{m}$  für Tier2,  $3,0 \mu\text{m}$  für Tier3 und  $4,2 \mu\text{m}$  für Tier4. Die Standardabweichungen betragen  $\sigma=0,7 \mu\text{m}$  für Tier1,  $\sigma=0,9 \mu\text{m}$  für Tier2,  $\sigma=0,6 \mu\text{m}$  für Tier3 und  $\sigma=1,1 \mu\text{m}$  für Tier4.

Im nächsten Schritt wurden die beiden Mittelwerte der Vergleichsgruppen gegenübergestellt, um die dreidimensionale Homogenität der Datensätze zu überprüfen (siehe Abbildung 38).

Beide Gruppen enthielten keine Ausreißer und hatten jeweils ein Versuchstier mit normalverteilten Werten, während die anderen Tiere keine normalverteilten Ergebnisse hatten. Somit wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, der eine Signifikanz von  $p \leq 0,0001$  hatte. Die Standardabweichung betrug bei den IF-Nebenachsen  $0,06 \mu\text{m}$  und bei den EM-Nebenachsen  $0,2 \mu\text{m}$ . Der Mittelwert der IF-Daten war um circa ein Drittel kleiner als jener der EM-Daten (IF-Mittelwert:  $2,2 \mu\text{m}$ ; EM-Mittelwert:  $3,2 \mu\text{m}$ ). So verhielt es sich auch bei der Standardabweichung (IF-Standardabweichung:  $0,6 \mu\text{m}$ ; EM-Standardabweichung:  $0,8 \mu\text{m}$ ) sowie beim Minimalwert (IF-Minimum:  $1,1 \mu\text{m}$ ; EM-Minimum:  $1,6 \mu\text{m}$ ). Die EM-Werte zeigten eine größere Spannweite als die IF-Daten (IF-Spannweite:  $3,2 \mu\text{m}$ ; EM-Spannweite:  $4,1 \mu\text{m}$ ). Wie bereits bei dem Vergleich der Mittelwerte der Nebenachse der Zellkerne, ist auch bei der Messung der Sphäroide erkennbar, dass die EM-Mittelwerte der Nebenachse größeren Streuungen unterliegen als die IF-Daten. Dies zeigt sich in einem Standardfehler von  $0,1 \mu\text{m}$  bei den IF-Werten und von  $0,2 \mu\text{m}$  bei den EM-Daten.

Der Vergleich der Mittelwerte der Nebenachsen der Sphäroide in den IF-Präparaten und den EM-Daten in  $\mu\text{m}$

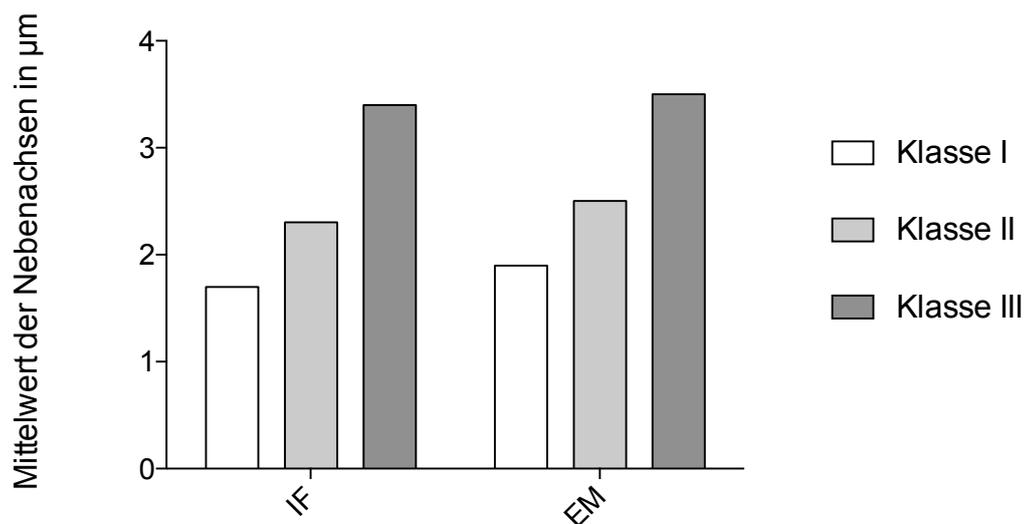


**Abbildung 38: Vergleich der Nebenachse der Sphäroide in den IF-Präparaten und den EM-Daten**

Der Standardfehler betrug bei den IF-Präparaten  $0,1 \mu\text{m}$  (N=89) und bei den EM-Daten  $0,16 \mu\text{m}$  (N=40); Auswertung: Mann-Whitney-U IF-Präparate gegen EM-Daten. \*\*\*  $p \leq .001$

Anschließend wurden die Messwerte der Nebenachsen und der Volumina der Sphäroide in die drei Klassen (siehe Tabelle 21) unterteilt und analysiert (siehe Abbildung 39). Die Graphik veranschaulicht, dass sich die Mittelwerte der Nebenachsen pro Klasse zwischen den beiden Vergleichsgruppen sehr ähnlich darstellen.

### Mittelwert der Nebenachsen der Sphäroide der IF- und EM-Daten, eingeteilt in die Klassen I-III anhand ihrer Nebenachsen



**Abbildung 39: Mittelwert der Nebenachsen der Sphäroide der IF- und EM-Daten, eingeteilt in die Klassen I-III anhand ihrer Nebenachsen**

Abbildung 39 zeigt die Einteilung der Sphäroide anhand ihrer Nebenachse in Klasse I-III. Klasse I wies einen Mittelwert von 1,7 µm (IF), bzw. 1,9 µm (EM) auf, Klasse II 2,3 µm (IF) bzw. 2,5 µm (EM) und Klasse III 3,4 µm (IF) bzw. 3,5 µm (EM). Die prozentuale Verteilung der Sphäroide auf die Klassen zeigte, dass die IF-Sphäroide am häufigsten Bestandteil der Klasse II waren, während die EM-Sphäroide am häufigsten in Klasse III waren.

Nebst der graphischen Veranschaulichung zeigen auch die gegenübergestellten Messdaten der Tabelle 22 ähnliche Werte für die IF- und die EM-Daten. Es wurde ersichtlich, dass der Mittelwert bei den IF- und den EM-Werten pro Klasse meist dem Median ähnelte. In Klasse I lag er leicht über dem Median, in den Klassen II und III waren die EM-Werte der Mediane und Mittelwerte gleich; die IF-Daten lagen leicht darunter. Insgesamt waren die EM-Werte im Vergleich zu den IF-Werten tendenziell erhöht.

**Tabelle 22: Vergleich der Mittelwerte der Nebenachse der IF- und der EM-Sphäroide pro Klasse in  $\mu\text{m}$**

	IF	EM
<b>Klasse I</b>	1,7 $\mu\text{m}$	1,9 $\mu\text{m}$
<b>Klasse II</b>	2,3 $\mu\text{m}$	2,5 $\mu\text{m}$
<b>Klasse III</b>	3,4 $\mu\text{m}$	3,5 $\mu\text{m}$

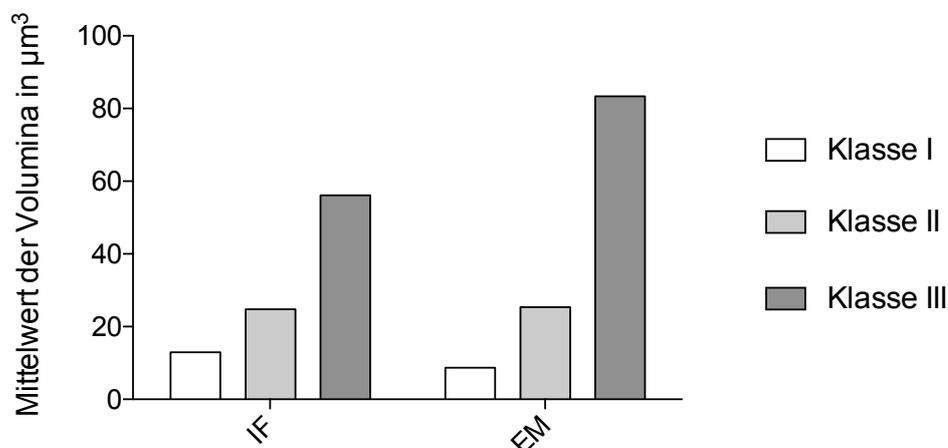
Des Weiteren war auch die prozentuale Verteilung der Messdaten pro Klasse von Interesse, um zu vergleichen, ob sich die beiden Vergleichsgruppen ähnlich auf die drei Klassengrößen verteilen (siehe Tabelle 23). Die Prozentsätze visualisieren, dass annähernd die Hälfte aller Messwerte der IF-Daten eine Nebenachse zwischen 2-3  $\mu\text{m}$  aufwies. Die EM-Sphäroide hatten am seltensten die Nebenachse der Klasse I und am häufigsten die der Klasse III. In beiden Vergleichsgruppen (IF und EM) enthalten die Klassen II und III mindestens 75 % aller Messwerte, während die Klasse I maximal 25 % der Ergebnisse umfasst.

**Tabelle 23: Vergleich der Anzahl an IF- und der EM-Sphäroide pro Klasse in Prozent**

	IF	EM
<b>Klasse I</b>	21,11 % (19/90)	18,2 % (6/33)
<b>Klasse II</b>	46,67 % (42/90)	33,3 % (11/33)
<b>Klasse III</b>	32,22 % (29/90)	48,5 % (16/33)
<b>Graphische Darstellung der Verteilung der Messwerte</b>		

Anschließend wurde die gleiche Untersuchung mit den Volumina durchgeführt, indem diese in die drei Klassen eingeteilt wurden, um einen größenspezifischen Vergleich zwischen den beiden Vergleichsgruppen vorzunehmen (siehe Abbildung 40).

Mittelwert der sphäroidalen Volumina der IF- und EM-Daten, eingeteilt in die Klassen I-III anhand ihrer Nebenachsen



**Abbildung 40: Mittelwert der Volumina der Sphäroide der IF- und EM-Daten, eingeteilt in die Klassen I-III anhand ihrer Nebenachsen**

Abbildung 40 zeigt die Einteilung der Sphäroide anhand ihres Volumens in Klasse I-III. Klasse I wies einen Mittelwert von  $12,92 \mu\text{m}^3$  (IF) bzw.  $8,7 \mu\text{m}^3$  (EM) auf, Klasse II  $24,75 \mu\text{m}^3$  (IF) bzw.  $25,4 \mu\text{m}^3$  (EM) und Klasse III  $56,15 \mu\text{m}^3$  (IF) bzw.  $83,4 \mu\text{m}^3$  (EM). Die prozentuale Verteilung der Sphäroide anhand ihrer Nebenachse auf die Klassen zeigte, dass die IF-Sphäroide am häufigsten Bestandteil der Klasse II waren, während die EM-Sphäroide in Klasse II und III am stärksten und dort gleichermaßen vertreten waren.

Während die Klasse II ähnliche Werte bezüglich der IF- und der EM-Mittelwerte aufzeigt, unterscheiden sich die der Klassen I und III stärker. Interessanterweise wurde außerdem ersichtlich, dass der Mittelwert der Volumina sich pro Klasse mit jeder höheren Klasse verdoppelte (siehe Tabelle 24).

**Tabelle 24: Vergleich der Mittelwerte der Volumina der IF- und der EM-Sphäroide pro Klasse in  $\mu\text{m}^3$**

	IF	EM
<b>Klasse I</b>	$12,92 \mu\text{m}^3$	$8,7 \mu\text{m}^3$
<b>Klasse II</b>	$25,75 \mu\text{m}^3$	$25,4 \mu\text{m}^3$
<b>Klasse III</b>	$56,16 \mu\text{m}^3$	$83,4 \mu\text{m}^3$

Die Volumina zeigten eine ähnliche Verteilung wie der Großteil der Messungen in Klasse II. Während die EM-Volumina in Klasse II und III gleichermaßen stark repräsentiert waren, nahm die Anzahl an IF-Werten in Klasse III ab.

Durch die Generierung der Klassen ließ sich daher feststellen, dass trotz starker Differenzen bezüglich der Streuung der Werte, die Größenverteilung der Nebenachsen und der Volumina sehr ähnlich waren. Zudem zeigte sich der Trend, dass die EM-Nebenachsen und -Volumina tendenziell größer ausfielen und einer stärkeren Spannweite unterlagen (siehe Tabelle 25).

**Tabelle 25: Vergleich der Anzahl an Volumina der IF- und der EM-Sphäroide pro Klasse in Prozent**

	IF	EM
<b>Klasse I</b>	21,11 % (19/90)	26,32 % (10/38)
<b>Klasse II</b>	48,89 % (44/90)	36,84 % (14/38)
<b>Klasse III</b>	30,00 % (27/90)	36,84 % (14/38)
<b>Graphische Darstellung der Verteilung der Messwerte</b>		

Im Folgenden wurden die Sphäroide in den IF- und EM-Daten anhand ihrer räumlichen Formen verglichen.

## 4.2 Die Vergleichsgruppen weisen ähnliche räumliche Formen des akuten, axonalen Schadens auf

Um die Sphäroide der IF- und den EM-Daten noch hinsichtlich ihrer Geometrie vergleichen zu können, wurden in einem weiteren Schritt die verschiedenen Formen des akuten, axonalen Schadens visuell analysiert und nach gemeinsamen Merkmalen klassifiziert. Auch hiermit wurde untersucht, in wie fern IF- und EM-Daten ähnliche Ergebnisse liefern, und in welchen räumlichen Formen der akute, axonale Schaden vorliegen kann.

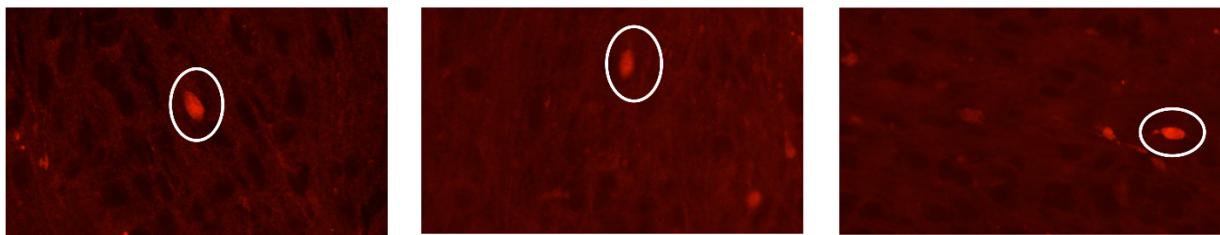
Im ersten Schritt wurden hierbei die Sphäroide in den IF-Daten analysiert.

#### 4.2.1 Der akute axonale Schaden der IF-Präparate kann unterschiedliche räumliche Formen annehmen

Die beschriebenen räumlichen Formen der APPA4-positiven Sphäroide waren in allen Versuchstieren in den Regionen 265-295 (Sidman et. al) vorhanden. Die beobachteten Strukturen wurden in allen drei Raumebenen auf ihre Form hin untersucht.

Es zeigten sich ovale Sphäroide (siehe Abbildung 41) und annähernd runde Strukturen (siehe Abbildung 42) sowie längliche Auftreibungen entlang der axonalen Längsachse (siehe Abbildung 43). Außerdem existierten häufig tropfenförmige Sphäroide, die einseitig spitz zuliefen (siehe Abbildung 44), sowie mehrere dicht aufeinander folgende Sphäroide innerhalb eines Axons (siehe Abbildung 45).

Abbildung 41 visualisiert ein Beispiel der ovalen Sphäroide in jedem Versuchstier der IF-Präparate. Diese zeigten sich in unterschiedlicher räumlicher Größe und kamen zahlreich und homogen im Präparat verteilt vor.



**A**

**B**

**C**

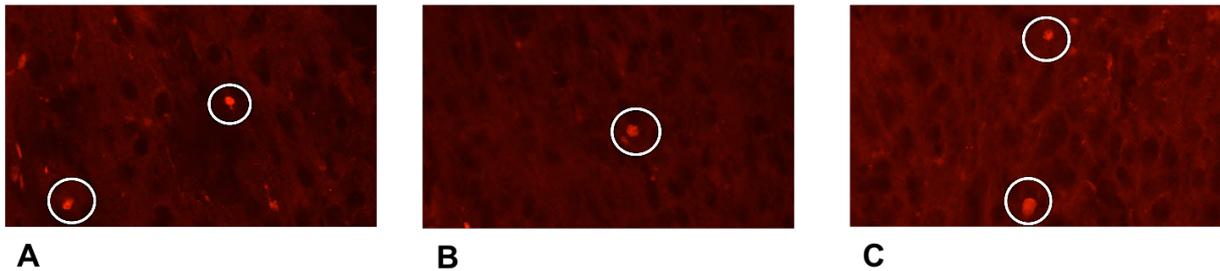
**Abbildung 41: Ovale APPA4-positive Sphäroide der 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstiere**

**(A):** Versuchstier TM269

**(B):** Versuchstier TM270

**(C):** Versuchstier TM271

Des Weiteren waren annähernd runde Sphäroide zu erkennen (siehe Abbildung 42). Auch diese fanden sich ubiquitär verteilt in allen Regionen. Je kleiner die kugelförmigen Sphäroide waren, desto zahlreicher waren sie vorhanden:



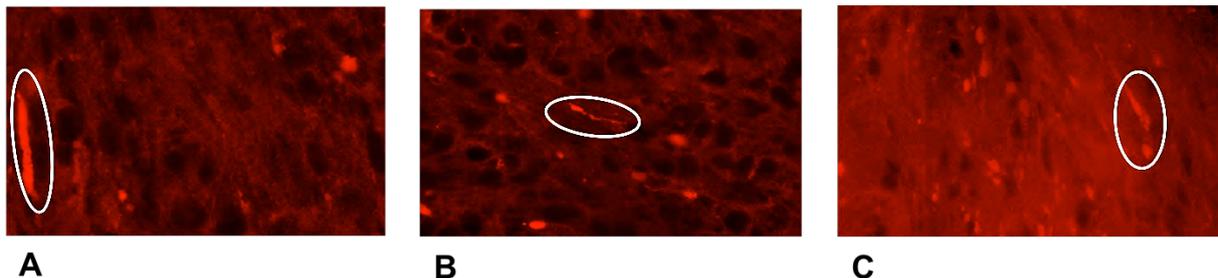
**Abbildung 42: Rundliche APPA4-positive Sphäroide der 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstiere**

(A): Versuchstier TM269

(B): Versuchstier TM270

(C): Versuchstier TM271

Seltener vorhanden waren längliche Sphäroide. Diese zeigten sich jedoch oft in Gruppierungen (siehe Abbildung 43). Zudem waren die länglichen Sphäroide immer in ähnlicher oder gleicher Ausrichtung vorhanden. Oft zeigten sie an einem Ende eine rundliche Erweiterung, die ein stärkeres, APPA4-positives Signal aufwies.



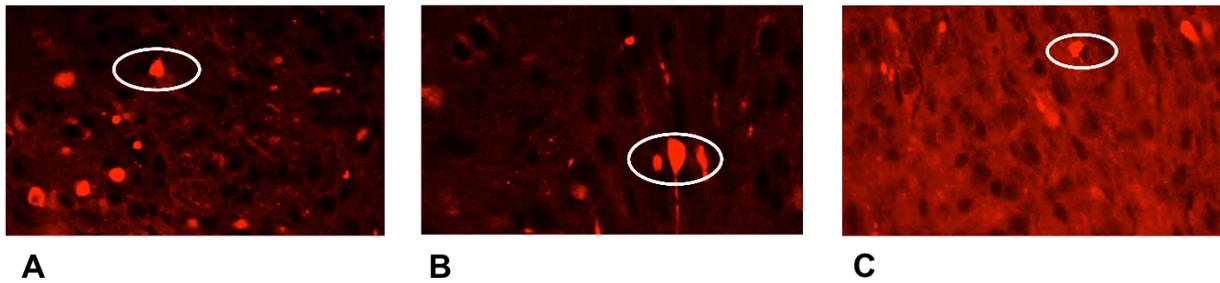
**Abbildung 43: Längliche APPA4-positive Sphäroide**

(A): Versuchstier TM269, rundliche Erweiterung am unteren Ende ersichtlich

(B): Versuchstier TM270, rundliche Erweiterung am oberen Ende ersichtlich

(C): Versuchstier TM271, zwei Sphäroide in räumlicher Nähe zueinander mit gleicher Ausrichtung

Neben den genannten Formen waren auch häufig tropfenförmige, dreieckige Sphäroide mit einem spitzen Winkel zu erkennen, die sich in allen Regionen und Versuchstieren befanden (siehe Abbildung 44). Auch diese waren seltener als die ovalen und runden Sphäroide vorhanden.



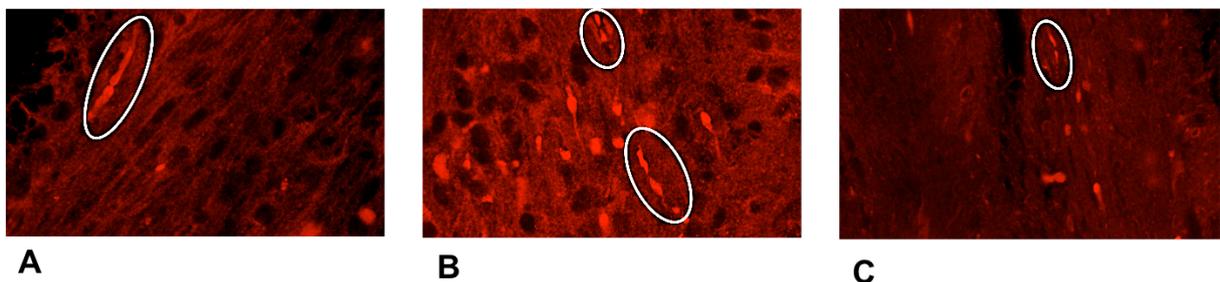
**Abbildung 44: Tropfenförmige APPA4-positive Sphäroide**

(A): Versuchstier TM269

(B): Versuchstier TM270

(C): Versuchstier TM271

Zuletzt ließen sich auch zusammenhängende Sphäroide mit mindestens zwei rundlichen Erweiterungen ausfindig machen, die häufig an den Enden des Sphäroids vorlagen (siehe Abbildung 45). Diese befanden sich meist in einer ähnlichen Ausrichtung wie die länglichen Sphäroide. Die Verbindung zwischen den sphäroidalen Erweiterungen fiel teilweise sehr grazil aus.



**Abbildung 45: Zwei dicht aufeinander folgende, zusammenhängende APPA4-positive Sphäroide**

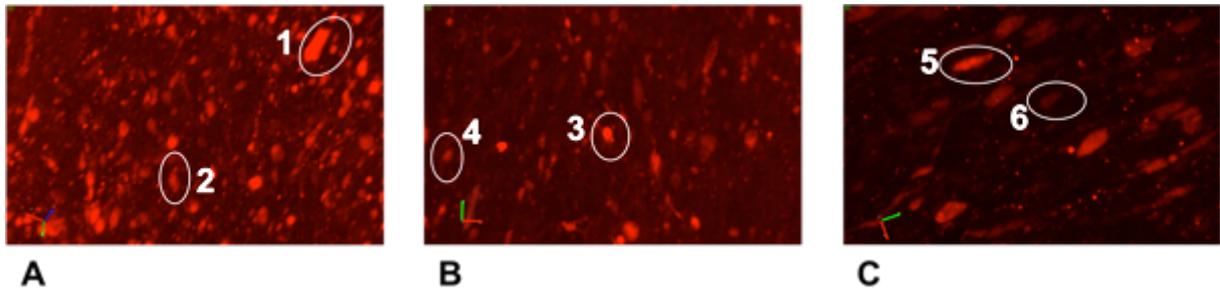
(A): Versuchstier TM269

(B): Versuchstier TM270

(C): Versuchstier TM271

Nebst den räumlichen Formen konnte in den immunfluoreszierenden Färbungen auch unterschiedlich starke Signale der Sphäroide wahrgenommen werden. Dies zeigte sich in weniger und stärker leuchtenden roten Sphäroiden (siehe Abbildung 46). Bei gleicher Prozessierung und Färbung variierte die Signalintensität sehr stark innerhalb eines Präparates wie auch zwischen den Präparaten selbst. Es lag keine Korrelation zwischen der Größe der Sphäroide und ihrer Signalstärke vor, wie auch nicht zwischen der Form und der Intensität. Während die Präparate unterschiedlich starke Hintergrundfärbungen trotz

gleichem Färbeprotokoll aufwiesen, lagen die APPA4-positiven Signale in ähnlichen Intensitätsstufen vor.



**Abbildung 46: Unterschiedlich starke APPA4-Signale der APPA4-positiven Sphäroide derselben Aufnahmeschicht**

(A): Versuchstier TM269; 1: starkes Signal; 2: schwaches Signal

(B): Versuchstier TM270; 3: starkes Signal; 4: schwaches Signal

(C): Versuchstier TM271; 5: starkes Signal; 6: schwaches Signal

Im Anschluss wurden die dreidimensionalen Formen der Sphäroide in den EM-Daten untersucht.

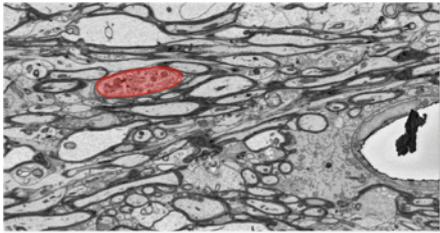
#### 4.2.2 Der akute, axonale Schaden der EM-Daten nimmt ähnliche, räumlichen Formen wie bei den IF-Präparaten an

Um die beiden Datensätze bezüglich ihrer geometrischen Formen zu vergleichen, wurde auch in dem EM-Datensatz die vorhanden, räumlichen Formen der Sphäroide beschrieben.

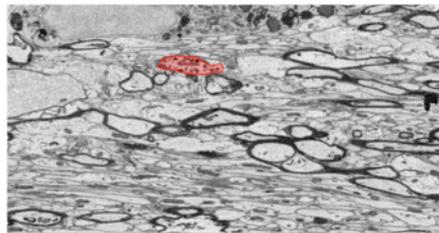
Die Geometrien, die in den IF-Präparaten gefunden wurden, waren auch in den EM-Daten in ähnlicher Gestalt in allen Versuchstieren vorhanden. Auch hier zeigten sich ovale (siehe Abbildung 47) sowie rundliche Auftreibungen (siehe Abbildung 48) und längliche Sphäroide entlang der Axone (siehe Abbildung 49). Es wurden mehrere dicht aufeinander folgende Sphäroide innerhalb eines Axons beobachtet (siehe Abbildung 50). Tropfenförmige Sphäroide, wie sie in den APPA4-positiven Färbungen vorhanden waren, wurden nicht explizit gefunden. Während über die Intensität des vorhandenen APPA4-Signals keine Aussage getroffen werden konnte, wurden in den EM-Daten Sphäroide mit myelinisierten und nicht-myelinisierten Arealen entlang der Axone erkannt. Dies ist in Abbildung 51 zu erkennen.

Abbildung 47 visualisiert ein ovales Sphäroid pro Versuchstier. Diese nahmen, wie auch bei den APPA4-Präparaten, keine streng ovale Form an. Sie unterschieden sich hinsichtlich ihrer

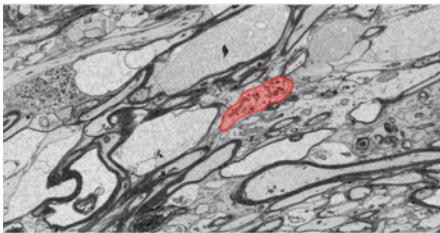
Größe und räumlichen Struktur stark voneinander und waren in ähnlicher Quantität auch in den IF-Präparaten zu finden.



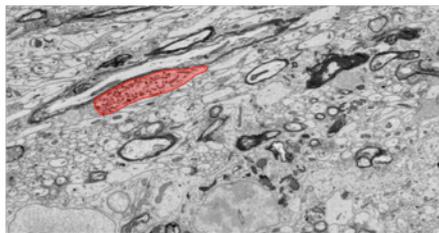
**A**



**B**



**C**



**D**

**Abbildung 47: Ovale Sphäroide der 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstiere**

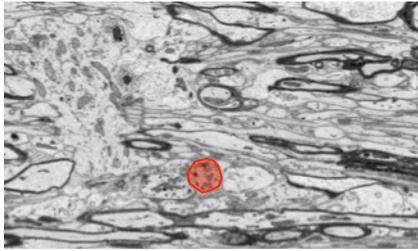
(A): Versuchstier B1

(C): Versuchstier B3

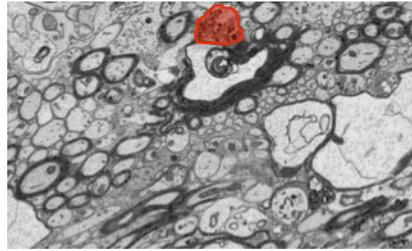
(B): Versuchstier B2

(D): Versuchstier B4

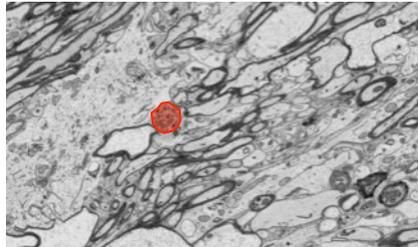
Die rundlichen Sphäroide zeigten sich, wie auch in den IF-Präparaten, zahlreich. Oft lagen sie in räumlicher Assoziation zu Mikrogliazellen (siehe Pfeil Abbildung 48D) vor. Auch hier variierten Größe und Quantität stark.



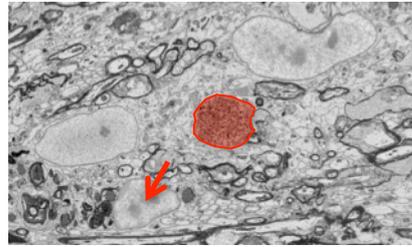
**A**



**B**



**C**



**D**

**Abbildung 48: Annähernd rundliche Sphäroide der 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstiere**

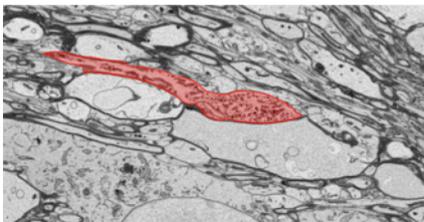
(A): Versuchstier B1

(B): Versuchstier B2

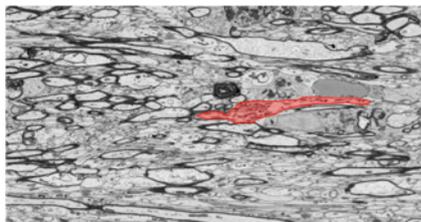
(C): Versuchstier B3

(D): Versuchstier B4

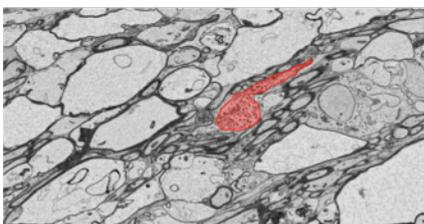
Abbildung 49 veranschaulicht längliche Sphäroide. Alle vier Ausschnitte zeigen die auch in den IF-Präparaten ersichtlichen, rundlichen Erweiterungen dieser Sphäroide, die zusätzlich eine verstärkte Zellorganellen-Akkumulation aufweisen.



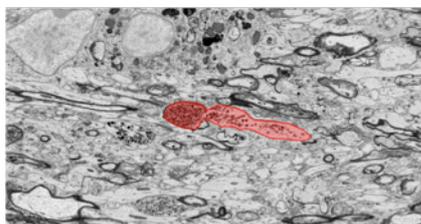
**A**



**B**



**C**



**D**

**Abbildung 49: Längliche Sphäroide der 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstiere mit teilweise ovoiden Enden**

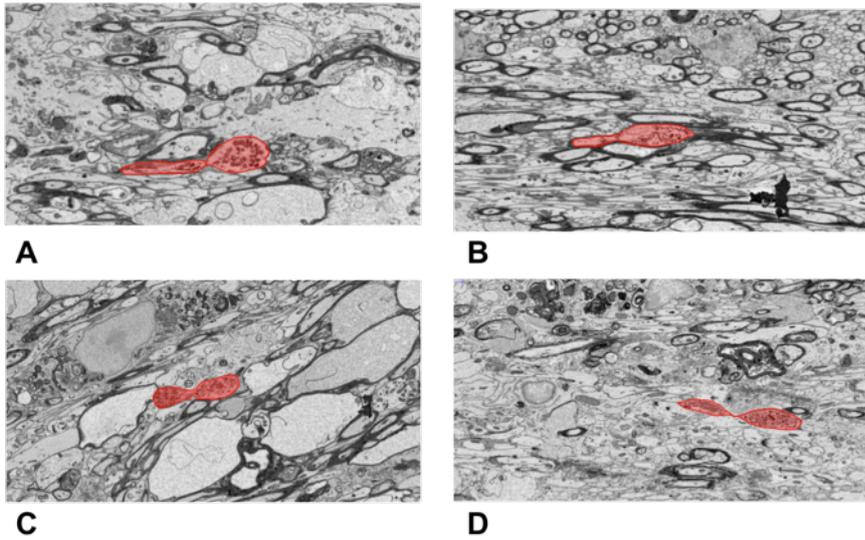
(A): Versuchstier B1

(B): Versuchstier B2

(C): Versuchstier B3

(D): Versuchstier B4

Auch die EM-Daten zeigten aufeinander folgende, miteinander verbundene Sphäroide, die in ähnlicher räumlicher Struktur wie in den IF-Präparaten vorlagen (siehe Abbildung 50).



**Abbildung 50: Zwei dicht aufeinander folgende Sphäroide der 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstiere**

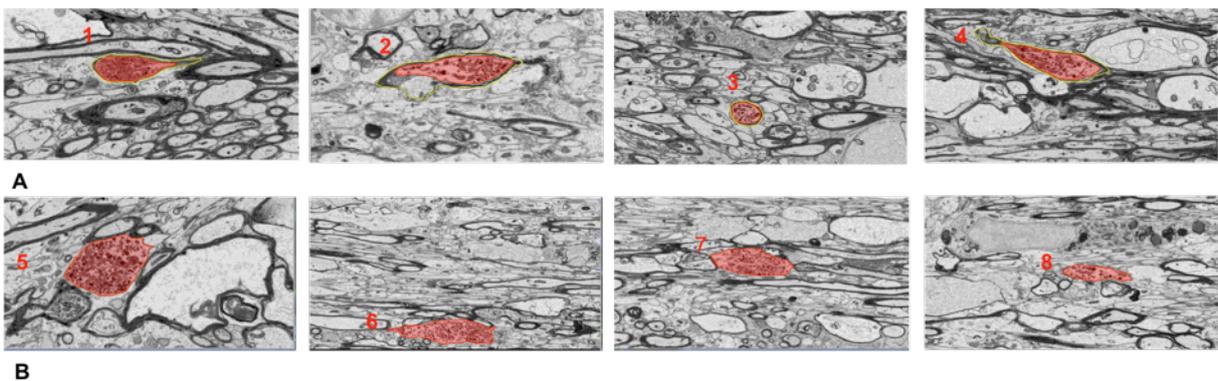
(A): Versuchstier B1

(B): Versuchstier B2

(C): Versuchstier B3

(D): Versuchstier B4

Abbildung 51 veranschaulicht, dass in allen 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstieren myelinisierte sowie nicht-myelinisierte Sphäroide vorhanden waren. So ist in Abbildung 51(A) in Bild 2 die lamellenförmige Abspaltung des Myelins erkennbar, und in Abbildung 51(A) in Bild 4 die unterschiedliche Schichtdicke der Membran.

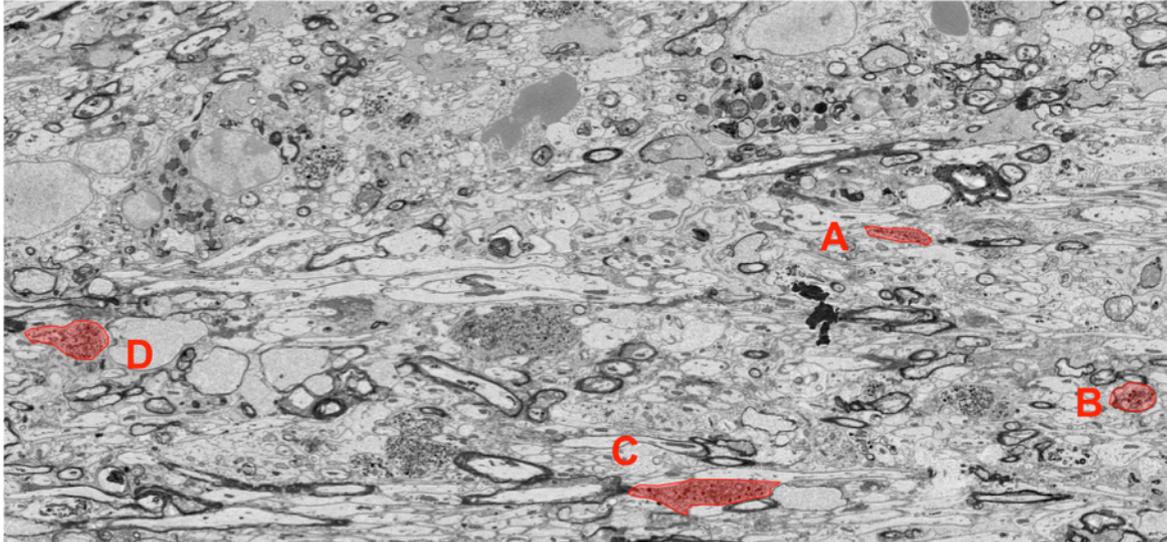


**Abbildung 51: Myelinisierte und nicht-myelinisierte Sphäroide der 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstiere**

(A): myelinisierte Sphäroide: 1: Versuchstier B1; 2: Versuchstier B2; 3: Versuchstier B3; 4: Versuchstier B4

(B): nicht-myelinisierte Sphäroide: 5: Versuchstier B1; 6: Versuchstier B2; 7: Versuchstier B3; 8: Versuchstier B4

Die Abbildung 52 veranschaulicht einen typischen Querschnitt des CC der 3-Wochen-Cuprizone-Versuchstiere der EM-Daten. Hierbei wird ersichtlich, dass die verschiedenen Formen der Sphäroide auch in räumlicher Nähe zueinander existieren und ubiquitär verteilt vorlagen.



**Abbildung 52: Verschiedene Formen der Sphäroide in räumlicher Nähe zueinander am Beispiel von Versuchstier B4**

(A): ovales Sphäroid

(B): rundliches Sphäroid

(C): längliches Sphäroid

(D): zwei dicht aufeinander folgende Sphäroide

In den IF- und den EM-Daten wurden die gleichen Formen der Sphäroide in allen Versuchstieren beobachtet. Die Formen der Sphäroide zeigten sich als sehr variabel und homogen in den Präparaten verteilt.

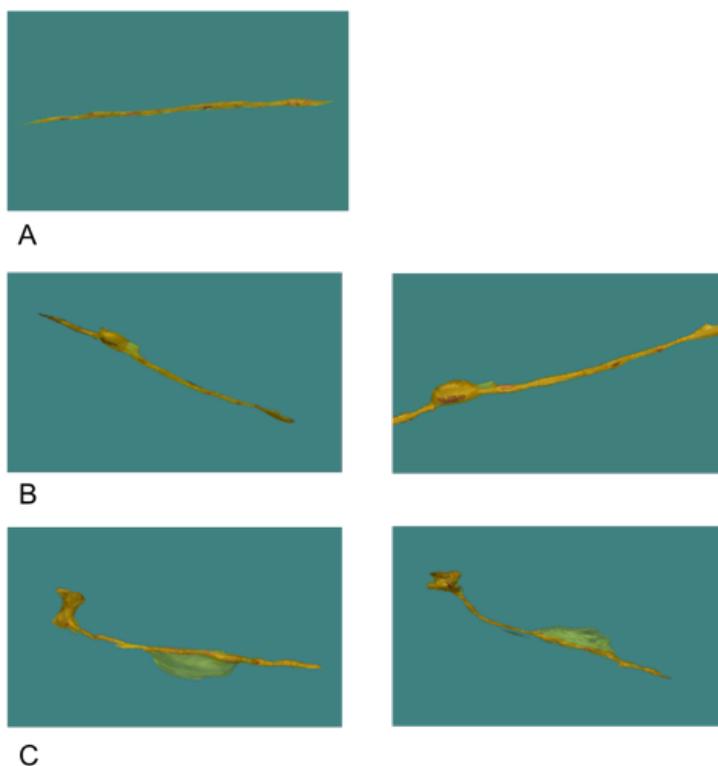
In einem nächsten Schritt wurden Sphäroide der EM-Scans dreidimensional rekonstruiert, um sie wie die IF-Daten räumlich betrachten zu können.

#### 4.2.3 Dreidimensionale Rekonstruktionen zeigen ähnliche räumliche Formen wie die zweidimensionale Analyse

Um die Sphäroide der beiden Datensätze auch in ihrer dreidimensionalen Struktur analysieren zu können, wurden räumliche Rekonstruktionen aus dem EM-Datensatz erstellt und mit den konfokalen Scans der IF-Präparate verglichen.

Auch hierbei zeigten die EM-Daten die gleichen Formen, wie sie in den IF-Präparaten in der 360°-Ansicht in NeuroLucida360® zu finden waren.

Abbildung 53 zeigt die dreidimensionalen Rekonstruktionen der Versuchs- und Kontrolltiere mit dem Programm BioVis3D®. Die Rekonstruktionen visualisieren die zweidimensional bereits bekannten, variablen Formen des axonalen Schadens in ihrer räumlichen Ausdehnung. Durch die Rekonstruktion der äußersten Myelinlamelle wurden myelinisierte und nicht-myelinisierte Areale an den degenerierten Axonen veranschaulicht (siehe Abbildung 53C). Es wurden Abspaltungen der Myelinlamellen von dem Axon festgestellt, sowohl bei Sphäroiden (siehe Abbildung 53B) als auch bei Axonen (siehe Abbildung 53C). Außerdem wurden Mitochondrien innerhalb der Axone rekonstruiert. Durch die Markierung der Mitochondrien wurde deutlich, dass die Zahl der Mitochondrien in den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren verringert war.



**Abbildung 53: Dreidimensionale Rekonstruktionen der Versuchs- und Kontrolltiere mit BioVis3D**

Orange: Axon; Gelb: äußerste Myelinlamelle; Violett: Mitochondrien

**(A):** Beispiel einer Rekonstruktion eines Axons eines Kontrolltieres

**(B):** Beispiel einer Rekonstruktion eines Axons eines Versuchstieres: Axonale Auftreibung im Sinne eines Sphäroids erkennbar

**(C):** Beispiel einer Rekonstruktion eines Axons eines Versuchstieres: Axonale Auftreibung im Sinne eines Sphäroids; Myelin-Abspaltung und nicht-myelinisiertes Areal erkennbar

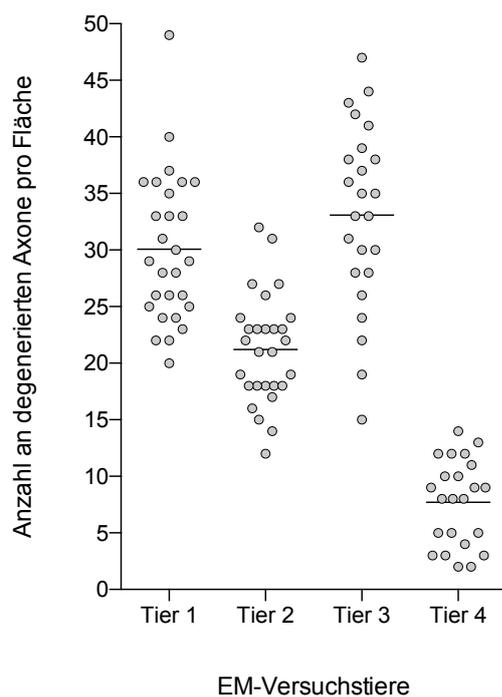
In einem letzten Schritt wurde die Anzahl der degenerierte Axone im EM-Datensatz von Versuchs- und Kontrolltieren verglichen.

### 4.3 Die Anzahl der degenerierten Axone in den Versuchstieren ist verglichen mit den Axonen der Kontrolltiere stark erhöht

Um statistisch darzustellen, dass axonale Degeneration bereits im frühen Stadium des Cuprizone-Modells stattfindet wurde die Anzahl der degenerierten Axone pro Fläche (204,54  $\mu\text{m} \times 61,36 \mu\text{m}$ ) pro Versuchstier der EM-Daten quantitativ bestimmt. Dies ist in Abbildung 54 zu erkennen. Anschließend wurde sie mit der Anzahl der degenerierten Axone pro Fläche der Kontrolltiere verglichen (siehe Abbildung 55).

Abbildung 54 visualisiert, dass die Anzahl degenerierter Axone pro Versuchstier zwischen einem Median von 8 (Tier4) und 34 (Tier3) stark variierte. Während die Ergebnisse von Tier1 und Tier3 noch ähnliche Werte annahmen, war die Anzahl im Schnitt bei Tier2, vor allem aber bei Tier4, stark erniedrigt. Ausgewertet wurden hierbei nahezu gleich viele Flächen pro Versuchstier.

Die Anzahl der degenerierten Axone pro Fläche



**Abbildung 54: Anzahl der degenerierten Axone pro Fläche pro Versuchstier**

Abbildung 54 zeigt die Anzahl degenerierter Axone pro Fläche der Versuchstiere. Die Werte waren normverteilt. Der Mittelwert lag für Tier1 bei 30,07 Stück; für Tier2 bei 21,21; für Tier3 bei 33,08 und für Tier4 bei 7,70 Stück pro Fläche. Die Standardabweichung betrug 6,57 für Tier1, 4,78 für Tier2, 8,14 für Tier3 und 3,80 für Tier4. Der Mittelwert aller Werte betrug  $23,14 \pm 5,82$ .



## 5. Diskussion

Die MS ist eine chronisch-entzündliche, neurodegenerative Erkrankungen des ZNS, die trotz intensiver Forschung noch nicht hinreichend geklärt ist. Hinsichtlich ihrer Ätiologie besteht sowohl die Hypothese, die MS sei eine primär entzündliche Erkrankung, wie auch die Annahme, sie sei primär neurodegenerativ. Um zu zeigen, dass bereits in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung neurodegenerative Prozesse bei der MS stattfinden, wurde mit dieser Arbeit der akute, axonale Schaden im Cuprizone-Tiermodell untersucht. Der akute, axonale Schaden wurde in zwei unterschiedlichen Datensätzen dreidimensional rekonstruiert und verglichen.

Es wurde gezeigt, dass nach drei Wochen 0,25%iger Cuprizone-Intoxikation der akute, axonale Schaden immunhistochemisch in Form von APPA4-positiven Sphäroiden und elektronenmikroskopisch durch sichtbare Akkumulationen von Zellorganellfragmenten vorhanden war.

Es wurde versucht eine Volumenzu- oder -abnahme aufgrund unterschiedlicher Prozessierung der Gewebe durch einen Umrechnungsfaktor statistisch zu kompensieren. Die hierfür vermessenen Nebenachsen der IF- und EM-Zellkerne zeigten eine Differenz von 31%. Hierbei waren die IF-Zellkerne um circa ein Drittel größer. Andersherum verhielt es sich mit den Nebenachsen der Sphäroide. Diese waren bei dem EM-Datensatz im Mittel um circa 45% größer. Auch die Mittelwerte der EM-Volumina waren mit einer Differenz von 40% größer als die der IF-Daten.

Innerhalb der IF-Daten fielen die Mittelwerte sehr homogen aus und hatten nur geringe Standardabweichungen. Die EM-Daten hatten größere Schwankungen der Mittelwerte und größere Standardabweichungen, insbesondere bei den gemessenen Volumina. Der Vergleich der Größenklassen erbrachte ein ähnliches Verteilungsmuster der zwei Datensätze pro Größenklasse.

Es wurden bei der deskriptiven Analyse der Formen der Sphäroide in IF- und EM-Daten sehr ähnliche, räumliche Strukturen erkannt. Innerhalb einer ROI waren rundliche, ovale, längliche sowie zusammenhängende Sphäroide mit mindestens zwei Auftreibungen vorhanden. Die degenerierten Axone pro Fläche waren bei den Gewebeschnitten der Versuchstiere deutlich höher als bei den Kontrolltieren. In der Kontrollgruppe fanden sich jedoch auch vereinzelt degenerierte Axone.

Im Folgenden werden Aspekte dieser Arbeit kritisch hinterfragt und in den bisherigen Forschungskontext gestellt.

## 5.1 Tiermodelle stellen eine geeignete Untersuchungsmethode in der MS-Forschung dar

Tiermodelle haben sich in der MS-Forschung hinreichend etabliert. Mit nur einem Modell lassen sich jedoch nicht alle Krankheitsaspekte induzieren (Procaccini et al. 2015). Außerdem unterscheidet sich der Ursprung der pathologischen Befunde in Tiermodellen und der MS. Tiermodelle der MS werden überwiegend an Ratten und Mäusen durchgeführt, weshalb ein exakter Rückschluss auf den Menschen fraglich ist (Torkildsen et al. 2008). Therapiemöglichkeiten müssen daher zunächst an humanen Zellkulturen erprobt werden, da sie beim Menschen oft nicht die gleiche Effizienz aufweisen (Drexler et al. 2010) oder Nebenwirkungen hervorrufen können (Vesterinen et al. 2010).

Tiermodelle bieten auch viele Chancen im Vergleich zu anderen Methoden. Während bei Autopsien oft aktive Läsionen mit Gewebeschäden fehlen, sind diese bei Tiermodellen zuverlässig induzierbar (Lucchinetti and Rodriguez 1997). Biopsien weisen oft eine Schwachstelle im Entnahmezeitpunkt auf, da sie noch vor gesicherter Diagnosestellung zur Erforschung des akuten, axonalen Schadens entnommen werden (Bitsch et al. 2000). Die Lokalisation axonaler Läsionen ist in Tiermodellen sehr gut prognostizierbar und in zahlreichen Tieren wie Ratten und Hamster induzierbar (Procaccini et al. 2015; Lassmann and Bradl 2017). Es lassen sich äußere Einflüsse besser ausschalten und Teilaspekte der Erkrankung differenziert betrachten (Bjelobaba et al. 2018; Lassmann and Bradl 2017).

Durch die Forschung an Tiermodellen wurden bereits Medikamente etabliert, die die Progredienz der Pathogenese verlangsamen können (Robinson et al. 2014). Tiermodelle fokussieren sich auf spezielle Aspekte der Erkrankung. Dies ist bezüglich der Fragestellung, ob es sich bei der MS um eine primär chronisch-entzündliche oder primär neurodegenerative Erkrankung handelt, von Interesse. So gibt es jeweils Modelle zur Erforschung der inflammatorischen und der degenerativen Komponente der MS.

Das meist genutzte inflammatorische Tiermodell ist die EAE, mit welchem sich Mechanismen der T-Zell-Infiltration untersuchen lassen (Kipp et al. 2017). So wurden durch die EAE Medikamente, wie Natalizumab, entwickelt (Bauer et al. 2009). Außerdem zeigte sich in der EAE die B-Zell-Therapie als nützlich (Ray et al. 2012).

Nicht-entzündliche Tiermodelle konnten zum Beispiel zeigen, dass Myelin-Proteolipid-Knockout-Mäuse kompromittierte Myelinlamellen entwickelten, die Axone anschwellen und degenerierten (Griffiths et al. 1998). Ähnliches zeigte auch die Unterdrückung der Expression des Myelin-assoziierten Glykoproteins (Barnett and Prineas 2004; Uschkureit et al. 2000). Dass die daraus resultierende, axonale Degeneration durch einen gestörten

Nährstofftransport ausgelöst wird, zeigte eine weitere Studie mit CNP-1-Knockout-Mäusen, die einen gestörten Metabolismus der Oligodendrozyten entwickelten (Lappe-Siefke et al. 2003).

Das Cuprizone-Modell ist ein autoimmun-unabhängiges Modell, das sich gut zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungen eignet, da reproduzierbare Demyelinisierungsherde induziert werden (Matsushima and Morell 2001). Mit ihm lässt sich der akute, axonale Schaden ohne primär inflammatorische Einflüsse untersuchen (Mana et al. 2009). Das Modell stellt eine Forschungsgrundlage für Therapien zur Verhinderung von De- und zur Förderung von Remyelinisierungen dar (van der Star et al. 2012).

Mit dem Cuprizone-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass die Mitochondriendichte demyelinisierter Axone wie bei aktiven MS-Läsionen zunimmt (Witte et al. 2009). Außerdem wurde im Cuprizone Modell, wie auch in MS-Läsionen (Rodriguez and Scheithauer 1994), das Absterben von Oligodendrozyten am distalen Ende ersichtlich (Ludwin and Johnson 1981).

## 5.2 Der akute axonale Schaden stellt ein primäres Phänomen der MS dar

Charcot beschrieb bereits 1868 in den ersten Veröffentlichungen über die MS den axonalen Schaden als initiales Phänomen der Krankheit (Kornek and Lassmann 1999).

Dennoch wurden die Ursprünge der MS zunächst primär in der entzündlichen Demyelinisierung der Axone gesehen (Bitsch et al. 2000). Innerhalb der letzten 20 Jahre zeigten Studien jedoch schon in frühen Krankheitsstadien axonale Läsionen (Trapp et al. 1998; Kuhlmann et al. 2002; Singh et al. 2013). Nikic et al. konnten in menschlichem sowie tierischem Material axonale Schäden aufgrund von mitochondrialen Veränderungen bei intakter Myelinlamelle beobachten (Nikic et al. 2011).

Der axonale Schaden ist auch Bestandteil vieler anderer neurodegenerativen Erkrankungen. Dies warf die Frage auf, inwiefern der MS ähnliche, primär neurodegenerative Prozesse wie bei Morbus Parkinson oder Alzheimer zugrunde liegen könnten (Haines, Inglese, and Casaccia 2011). Diese Überlegung stützte anstatt der bisher gültigen Outside-In-Theorie (Stys et al. 2012) die These der Inside-Out-Theorie (Stys et al. 2012).

Bislang existieren zahlreiche Theorien über die Ätiologie der Transportdefizite, die das Axon schädigen. Eine Hypothese besagt, dass aufgrund eines erhöhten Energiebedarfs demyelinisierter Axone die mitochondriale Aktivität verringert wird, und folglich zu wenig ATP

für eine  $\text{Ca}^+$ -Homöostase produziert wird (Nicot et al. 2003; Trapp and Stys 2009). Dies führe zu einem gestörten axonalen Transport (Geurts et al. 2009; Nave and Trapp 2008). Im Tiermodell wurde der Verlust von spinalen Motoneuronen aufgrund von  $\text{CD4}^+$ - und  $\text{CD8}^+$ -T-Zell-Infiltrationen (Vogt et al. 2009) und eine Korrelation zwischen der Anzahl an  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen und dem Ausmaß des axonalen Schadens und der  $\text{CD8}$ -T-Zell-Präsenz im Gehirn (Babbe et al. 2000), Blut (Crawford et al. 2004) und Liquor (Skulina et al. 2004) festgestellt. Dies ließ darauf schließen, dass  $\text{CD8}$  eine wichtige Funktion des axonalen Schadens übernimmt (Haines, Inglese, and Casaccia 2011). Ergebnisse von Studien legen nahe, dass eine direkte axonale Schädigung durch  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen aufgrund ihrer Perforin-Freisetzung (PRF1) (Cappellano et al. 2008) oder eine antikörpervermittelte, axonale Schädigungen aufgrund von Neurofilament light chain-Injektionen (NFL) bei Mäusen (Huizinga et al. 2008) vorliegt. Weitere Forschungsgruppen fanden in Serum und Liquor von MS-Patienten Autoantigene gegen neuronale und axonale Antigene (Magliozzi et al. 2007). Auch diese Ergebnisse weisen auf neurodegenerative Prozesse hin. Außerdem konnte Kim et al. in der Phase des akuten, axonalen Schadens im Cuprizone-Modell und in menschlichem Gewebe das nukleare Enzym Histon Deacetylase-1 (HDAC1) im Zytosol nachweisen. Diese Enzym führe zu einem gestörten, mitochondrialen Transport aufgrund von Komplexbildung mit Motorproteinen (Kim et al. 2010).

Viele Forschungsergebnisse konnten bislang die Inside-Out-Theorie stützen. So kommt es bei MS- Patienten mit chronischer Erkrankung über 10 Jahre trotz fehlender akuter Entzündungszeichen zu der Durchtrennung von zuvor geschädigten Axonen (Kuhlmann et al. 2002). An RRMS-Patienten konnten intakte Myelinlamellen an geschädigten Axonen und ein Verlust von bis zu 22 % der Axone gezeigt werden. Außerdem wurden zahlreiche Myelinlamellen ohne Anzeichen eines darin befindlichen Axons beobachtet (Bjartmar et al. 2001), wie sie auch in den EM-Daten dieser Arbeit zu finden waren (siehe Abbildung 50).

Aufgrund von Studien an Autopsie-, Biopsie-Material und Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass der axonale Schaden bei der MS den klinisch gravierendsten Einfluss auf den Behinderungsgrad hat (Bitsch et al. 2000; Kuhlmann et al. 2002; Haines, Inglese, and Casaccia 2011; Bruck 2005; Trapp and Nave 2008). Dies begründet sich laut Trapp et al. darin, dass der axonale Schaden zu der Durchtrennung der Axone führt (Trapp et al. 1998). Mittlerweile gilt es als gesichert, dass der axonale Schaden bereits frühzeitig stattfindet. Aufgrund der Irreversibilität der Durchtrennung und Degeneration der Axone bilden sich früh unwiderrufliche Funktionsdefizite (Trapp and Nave 2008). Diese Erkenntnisse führten dazu, dass die Untersuchung des axonalen Schadens zu einem Schwerpunkt der MS-Forschung wurde, in der Hoffnung, weitere Einsichten hinsichtlich der Pathogenese und der Therapie gewinnen zu können (Criste, Trapp, and Dutta 2014). In der Tat wurde mithilfe eines

Tiermodells der Chacrot-Marie-Tooth-Krankheit gezeigt, dass Therapien, die defizitäre Transportmechanismen wiederherstellen, die axonale Degeneration verlangsamen können (d'Ydewalle et al. 2011; Denton et al. 2014).

Bis heute ist ungewiss, ob der primäre Krankheitsauslöser der MS neurodegenerativer oder immunologisch-entzündlicher Art ist (Trapp and Nave 2008).

### 5.3 Defizite des anterograden Transports lassen sich durch die Visualisierung von APPA4-Akkumulationen darstellen und analysieren

Zur Untersuchung des akuten, axonalen Schadens haben sich Marker für Proteine und Organellen etabliert, die im Zusammenhang mit einem gestörten axonalen Transport stehen und immunhistochemisch zu detektieren sind (Williamson and Cleveland 1999; Hares and Wilkins 2017). Sherriff et Al. verglichen in ihrer Arbeit von 1994 bereits Marker für den axonalen Schaden, wie APP, SNAP-25, Chromogranin A und Cathepsin D. APP eignete sich in ihren Untersuchungen am besten (Sherriff et al. 1994).

APP ist ein integrales Membranprotein, das in intakten Axonen sehr schnell anterograd transportiert wird und unter axonalen Transportdefiziten innerhalb axonaler Auftreibungen akkumuliert. Somit eignet sich APP zur Untersuchung des akuten, axonalen Schadens und wurde für die Untersuchung der vorliegenden Arbeit gewählt. Dort konnte der akute axonale Schaden mithilfe der Anti-APP-Färbung in Form von APP-Sphäroiden dargestellt werden (siehe Abbildung 8).

Bei der MS lassen sich APP-Akkumulationen sowohl in aktiven Läsionen als auch in inaktiven und remyelinisierten Arealen finden (Ferguson et al. 1997; Bitsch et al. 2000; Kornek et al. 2000). Die Akkumulationen stellen ein frühes Merkmal der MS dar und ließen sich am häufigsten bei Patienten mit einer Erkrankungsdauer von unter einem Jahr finden (Kuhlmann et al. 2002).

Weitere Studien mit APP erbrachten, dass die Expression von Stickstoffmonoxid-Synthasen in quantitativer Korrelation zur APP-Akkumulationen und somit zur funktionellen Störung von Axonen standen. Stickstoffmonoxid-Synthasen produzieren Stickstoff, welcher axonale Weiterleitungen blockiert (Aboul-Enein et al. 2006).

Immunfluoreszierende Untersuchungen mit dem Marker APPA4 erlauben dreidimensionale Analysen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit diskutiert und in den Kontext bisheriger Forschungen gestellt.

## 5.4 Der akute, axonale Schaden lässt sich in der räumlichen Darstellung von Sphäroiden in IF- und EM-Daten vergleichen

IF und EM-Analysen wurden in der MS-Forschung bereits gut etabliert. Immunfluoreszierende Untersuchungen bieten den Vorteil, gezielt Proteine und Strukturen in ihrer Quantität und Qualität nachweisen zu können. Elektronenmikroskopische Daten erlauben es, das Gewebe ultrastrukturell darzustellen. Ein direkter Vergleich dieser Daten existiert nach der Kenntnis des Autors jedoch noch nicht.

### 5.4.1 Die Erstellung eines Umrechnungsfaktors zwischen IF- und EM-Daten

Die Gewebe der beiden Datensätze wurden unter denselben Bedingungen innerhalb des gleichen Tierversuches gewonnen, jedoch unterschiedlich verarbeitet. Daher lassen sich Volumenveränderungen nicht ausschließen. So wurde ein Umrechnungsfaktor erstellt, um Volumenveränderungen durch die Verarbeitung zu berücksichtigen.

Da sowohl die Nebenachsen der IF- als auch der EM-Zellkerne homogene Mittelwerte und geringe Standardabweichungen hatten (siehe Abbildung 28 und 29), wurden diese zur Erstellung des Umrechnungsfaktors genutzt. Auch Trapp et al. nutzten für ihre Untersuchung der Sphäroide den maximalen Durchmesser als Kriterium (Trapp et al. 1998). Kritisch zu betrachten ist jedoch der unterschiedliche Stichprobenumfang beider Vergleichsgruppen dieser Arbeit (siehe Abbildung 30).

Die Mittelwerte der EM-Daten waren nach Anwendung des Umrechnungsfaktors um circa 30 % größer als die der EM-Daten. Ohne die Verwendung des Faktors ergäben sich deutlich geringere Differenzen. Dies ließ die Annahme zu, einen anderen Umrechnungsfaktor zur statistischen Bereinigung der Prozessierungsunterschiede zu benötigen.

### 5.4.2 Einschlusskriterien für den Vergleich der Volumina

Da die meisten der gemessenen Sphäroide eine Nebenachse von 1µm - 4µm besaßen, wurde die Auswahl der auszuwertenden Sphäroide auf diesen beschränkt (siehe Abbildung 32). Hierbei lässt sich diskutieren, ob dieses Einschlusskriterium notwendig ist. Einen Nachteil stellt der Ausschluss einiger Sphäroide dar; ein Vorteil ist die Möglichkeit einer Einteilung der Messungen in Klassen. Diese Klassen ließen weiterführende Vergleiche untereinander zu. Außerdem ergab sich so eine homogenere Stichmenge.

Auch der Vergleich der Nebenachsen der Sphäroide ergab homogene Mittelwerte mit sehr ähnlichen Standardabweichungen, die noch geringer ausfielen als die der

Zellkernmessungen. Die IF-Werte fielen jedoch anders als zuvor um circa 45 % kleiner aus als die Werte der EM-Daten (siehe Abbildung 38). Ein mutmaßlicher Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Vorgehensweisen bei den Messungen darstellen oder die geringere Auflösung der IF-Daten im Vergleich zu dem EM-Datensatz.

#### 5.4.3 Der Vergleich der Volumina von IF- und EM-Daten

Bei der Volumenmessung der Sphäroide variierten die Ergebnisse wesentlich stärker als bei den Zellkern-Vergleichen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen IF-Versuchstiere nahmen ähnliche Werte an, die Standardabweichung war weitaus höher als bei den Messungen der Nebenachse (siehe Abbildung 35).

Das gleiche Phänomen stellte sich auch bei den einzelnen Werten der EM-Volumina dar, mit nochmals erhöhter Spannweite und Standardabweichung und stark voneinander abweichenden Mittelwerten (siehe Abbildung 34). Ursache dessen dürfte der geringe Stichprobenumfang sein. Dies führte auch dazu, dass nicht gleich viele Volumenmessungen pro Versuchstier vorgenommen werden konnten, was eine zusätzliche Verzerrung der Ergebnisse darstellen könnte. Um dies genauer zu analysieren, wäre ein größerer EM-Datensatz notwendig.

Die Spannweite und Standardabweichung der Nebenachsen und Volumina zeigen, dass ein Rückschluss von der Nebenachse auf das Volumen als kritisch zu betrachten ist. Eine mögliche Ursache liegt in den zahlreichen, unterschiedlichen Formen der Sphäroide, während die Zellkerne eine annähernd rundliche Struktur aufweisen. Aufgrund dessen wurden im Folgenden die verschiedenen Formen der Sphäroide analysiert.

Eine weitere Hypothese, die mit den Analysen von Trapp et al. (Trapp et al. 1998) und Nikic et al. (Nikic et al. 2011) in Zusammenhang stehen, ist, dass der axonale Schaden in seiner akuten Form durch längliche, sphäroidale Auftreibungen entlang der Axone auftritt, die sich zu rundlichen Sphäroiden entwickeln. Wären die Sphäroide überwiegend rundlicher Gestalt, wäre anzunehmen, dass sich die Standardabweichungen zwischen der Nebenachse und Volumen proportional zueinander verhielten, wie oben skizziert. Eine Ursache der großen Standardabweichung der sphäroidalen Volumina könnte folgende Hypothese sein: Zahlreiche Sphäroide an einem Axon weisen kleinere Volumina pro Sphäroid auf als Axone mit quantitativ weniger ausgebildeten Sphäroiden.

Interessant ist zudem, dass sich die Zellkerne bei der Messung der Nebenachse in den IF-Daten als circa ein Drittel größer dargestellt haben als jene der EM-Daten. Auf diesen Werten beruhte die Erstellung des Umrechnungsfaktors. Die anschließenden Messungen der

Nebenachse der Sphäroide und der Volumina zeigten jedoch ein umgekehrtes Verhältnis der EM-Daten. Diese waren circa ein Drittel größer als die IF-Daten. Somit lässt sich diskutieren, ob ein Umrechnungsfaktor der beiden Datensätze tatsächlich notwendig ist. Allerdings stellen die divergenten Werte der Nebenachse der Zellkerne ein starkes Argument für einen Umrechnungsfaktor dar. Dies wirft die Frage auf, ob der Umrechnungsfaktor mit einer anderen Methode erstellt werden sollte. Hierfür könnte das Verhältnis der Zellkernvolumina von EM- und IF-Daten verwendet werden.

#### 5.4.4 Der Vergleich von IF- und EM-Daten anhand von Größenklassen

Anschließend folgte die Analyse der Größenklassen anhand der Nebenachsen und der Volumina der Sphäroide. Die Messungen ergaben, dass die IF- Nebenachsen im Mittel kleiner ausfielen als die der EM-Sphäroide (siehe Tabelle 22). Die EM-Sphäroide hatten tendenziell eine größere Nebenachse als die IF-Sphäroide. Auch die prozentuale Verteilung der EM-Volumina zeigte dies (siehe Tabelle 23). Gleiches wurde mit den IF- und EM-Volumina durchgeführt. Da der EM-Mittelwert in Klasse I kleiner und in Klasse III größer war als bei den IF-Werten war, konnte auch hierdurch die größere Spannweite der EM-Daten gezeigt werden (siehe Tabelle 24). Da in der Klasse mit den meisten Werten (Klasse II) der Median und der Mittelwert zusammenfielen und auch die IF- und die EM-Werte sich ähnlich zeigten, lässt sich vermuten, dass bei einer größeren Stichmenge die Werte homogener wären. Auch diese Beobachtung stützt eine kritische Betrachtung des Umrechnungsfaktors und der kleinen Stichprobe.

Es existiert nur eine geringe Anzahl an Vergleichen zwischen verschiedenen Untersuchungsmethoden der MS. Eine davon stellt die Veröffentlichung von Höflich et al. dar, in der der akute, axonale Schaden in drei Tiermodellen (EAE; Cuprizone-Modell, Lysolecithin-Modell) verglichen wird. Unter der Verwendung von Anti-APP4 konnten in allen drei Modellen APP-Akkumulationen nachgewiesen werden sowie eine erhöhte Immunreaktivität von Proteinen wie dem vesikulären Glutamattransporter VGluT1 (Höflich et al. 2016).

Die meisten Differenzen der beiden Datensätze könnten sich durch den Umrechnungsfaktor sowie die unterschiedlich großen Stichproben der Datengruppen erklären lassen. Daher wäre es von großem Interesse, diesbezüglich weitere Analyse durchzuführen.

## 5.5 Die dreidimensionale Gestalt der Sphäroide nimmt in IF- und EM-Daten ähnliche Formen an

Um möglichst früh therapeutisch gegen die Schädigung von Axonen vorgehen zu können, kann es von Interesse sein, den akuten, axonalen Schaden in all seinen räumlichen Formen erkennen zu können. Vorausgegangene Studien haben bereits bewiesen, dass der akute axonale Schaden in unterschiedlichen Darstellungsformen vorliegen kann. So wurden beispielsweise längliche, axonale Auftreibungen entlang der Axone sowie an ihrem proximalen Ende gefunden (Trapp et al. 1998). Wie in dieser Arbeit auch, wurden hierfür die Nebenachsen der Sphäroide vermessen. Des Weiteren wurden regentropfenförmige Sphäroide im CC beschrieben (Hoflich et al. 2016).

Die Autoren dieser Arbeit sahen in der räumlichen Darstellung der Sphäroide eine weitere wichtige Ergänzung zur Analyse des akuten, axonalen Schadens. Anhand des konfokalen EM-Datensatzes rekonstruierten wir Sphäroide dreidimensional. Auch dieser Vergleich ist bislang noch nicht durchgeführt worden.

Es wurde eine Vielzahl an Formen der Sphäroide gefunden. Diese bestanden aus rundlichen sowie ovalen, länglichen und mehreren zusammenhängenden Sphäroiden (siehe Abbildungen 41-59). Jede Form, die in den IF-Daten gefunden wurde, konnte, bis auf die tropfenförmigen Sphäroide, auch in den EM-Daten detektiert werden. In beiden Datensätzen lagen mehrere der genannten Formen nebeneinander vor und waren in allen Versuchstieren zu detektieren (siehe Abbildung 51).

In den EM-Daten sowie in den dreidimensionalen Rekonstruktionen konnte zwischen myelinisierten und nicht-myelinisierten Sphäroiden unterschieden werden. Zudem fielen auch leer imponierende Myelin-Lamellen in den Aufnahmen auf (siehe S. 98). Hierbei zeigte sich, dass Axone existierten, bei denen sich Myelinlamellen von den Axonen lösten und sich Hohlräume zwischen den beiden Gewebearten bildeten (siehe Abbildung 51). Die Ergebnisse bezüglich der räumlichen Gestalt der IF-Sphäroide decken sich mit den Beschreibungen von Trapp et al. und Höflich et al. (Trapp et al. 1998; Hoflich et al. 2016).

## 5.6 Der akute axonale Schaden führt zu degenerierten Axonen

Unter einer Degeneration versteht man im medizinischen Sinne eine strukturelle und/oder funktionelle Abweichung von der Norm. Die axonale Degeneration bezeichnet alle Formen der Veränderung eines Axons und ist das Leitsymptom neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Alzheimer.

Da neben inflammatorischen Prozessen die axonale Degeneration auch bei der MS bereits im akuten Stadium identifiziert wurden, lässt sich weder der inflammatorische noch der neurodegenerative Hintergrund der Erkrankung ausschließen.

Die der Arbeit zugrundeliegenden EM-Daten zeigten nach drei Wochen zahlreiche Läsionen akuter Degeneration (siehe Abbildung 27). Im quantitativen Vergleich der degenerierten Axone pro Fläche zwischen Versuchs- und Kontrolltieren wurde ersichtlich, dass unter der dreiwöchigen, 0,25%igen Cuprizone-Gabe mehr Axone zu Grunde gingen als innerhalb der Kontrollgruppe. Dies konnte mit EM-Aufnahmen von vier Versuchstieren gezeigt werden (siehe Abbildungen 54 und 55). Da die Versuchstiere gleichen genetischen Ursprungs sind, unter exakt den gleichen Versuchsbedingungen gehalten wurden und ihr Gewebe gleich bearbeitet wurde, könnte sich diese Differenz durch den Einfluss der menschlichen Auswertung der Daten, die Einschlusskriterien der Datenerhebung erklären oder durch neuronale Plastizität. Unter dieser versteht man die Fähigkeit des Nervensystems zur eigenen funktionellen und strukturellen Modulation aufgrund von Erfahrungen und Schäden (von Bernhardt, Bernhardt, and Eugén 2017). Zur genaueren Analyse dessen wäre eine erneute Untersuchung oder eine Auswertung mit einer größeren Anzahl an Versuchstieren von Interesse.

Außerdem fällt auf, dass die Standardabweichung bei allen Tieren relativ hoch ist. Dies lässt vermuten, dass die Degeneration innerhalb des CC nicht überall homogen stattfindet. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass nach nur drei Wochen die Anzahl der APPA4-Sphäroide zwischen den einzelnen Präparaten wie auch den Tieren variiert. In der Analyse werden diese Beobachtung und die Lage der degenerierten Axone statistisch nicht erfasst. Weiterführende Studien wären hierfür empfehlenswert.

Des Weiteren zeigt sich, dass auch in den Kontrolltieren geringfügige Degenerationen aufzufinden waren (siehe Abbildung 55). Da Axone keiner regulären Zellregeneration unterliegen, lässt sich hier unter anderem vermuten, dass auch dies im Rahmen der neuronalen Plastizität stattfindet. Aufgrund von Lernprozessen des Gehirns können sich Synapsen auf- und abbauen, ihre Aktivität intensiviert oder abgemildert werden sowie eine Veränderung durch Alterungsprozesse stattfinden. Hierdurch könnte sich die geringe Zahl an degenerierten Axonen innerhalb der Kontrolltiere begründen

## 5.7 Ausblick

Unserer Auffassung nach stellt diese Arbeit den ersten, dreidimensionalen Vergleich des akuten, axonalen Schadens in IF- und EM-Daten dar. Unsere Ergebnisse lieferten dabei auch weitere Fragestellungen für folgende Analysen.

Neben einem Datenvergleich zwischen IF- und EM-Präparaten eines anderen toxischen Tiermodells wäre es von Interesse, den axonalen Schaden nach drei Wochen und längerer Intoxikation zu analysieren. Außerdem ließe sich die akute mit der chronischen Form vergleichen. Es ist zu vermuten, dass die Anzahl an APP-Akkumulationen mit der Progredienz der Erkrankung abnimmt und in der chronischen Phase nicht mehr zu finden ist (Gentleman et al. 1993; Geddes et al. 1997). Von Interesse wäre auch die Verwendung eines anderen Markers des axonalen Schadens, wie etwa die nicht-phosphorylierte Form des NFH (engl. neurofilament heavy chain) (Watson et al. 1991). Die erwähnte Vergleichsstudie fokussierte sich auch auf Analysen des Spinalkanals (Hoflich et al. 2016). Die vorliegende Arbeit ließe sich für eine breitere Datenlage daher um den Vergleich zwischen Gewebe des CC und des Rückenmarks erweitern. Aufgrund der Ergebnisse kann vermutet werden, dass eine alternative Generierung eines Umrechnungsfaktors sinnvoll sein könnte. Hierbei wäre die Erstellung eines Faktors durch die Division des mittleren Volumens der Zellkerne der IF- und der EM-Daten eine Variante. Für weitere Vergleiche wäre auch die Gegenüberstellung der sphäroidalen Dichte an APPA4 oder die Anzahl der Sphäroide pro Volumen interessant.

Des Weiteren wurden deskriptiv die verschiedenen Formen des akuten, axonalen Schadens untersucht. Darauf könnte mit quantitativen und qualitativen Auswertungen aufgebaut werden. Es wäre denkbar, dass gewisse Formen häufiger als andere pro Volumen auftreten oder Formen in bestimmten Lokalisationen zahlreicher aufzufinden sind.

In einem letzten Schritt wurden die degenerierten Axone pro Fläche der EM-Daten quantitativ untersucht und Versuchstiere mit Kontrolltieren verglichen. Mit einer zusätzlichen Myelin-Färbung der IF-Präparate könnte auch dieser Aspekt verglichen werden.

Die bisher gewonnenen Resultate und weiterführenden Fragen lassen den Schluss zu, dass hiermit neue Erkenntnisse über die Ätiologie und Therapie der MS zu gewinnen sind.

## 6. Zusammenfassung

Die MS ist eine der häufigsten, neurologischen Erkrankungen, deren Ätiologie trotz intensiver Forschung noch immer ungeklärt ist. Tiermodelle stellen einen grundlegenden Teil der MS-Forschung dar. Das Cuprizon-Modell dient hierbei der Analyse neurodegenerativer Prozesse der MS.

Als Indikator früher degenerativer Prozesse der MS, dient der akute, axonale Schaden. Er zeigt sich in Form von sphäroidalen Auftreibungen entlang der Axone.

Ziel dieser Arbeit war es, die Sphäroide dreidimensional zu analysieren und IF- und EM-Daten zu vergleichen. Hierfür wurden im ersten Schritt IF-Färbungen mit dem Marker Anti-APPA4 durchgeführt und mit einem konfokalen DSU-Fluoreszenzmikroskop digitalisiert. Im zweiten Schritt wurde aus Gewebe des gleichen Versuchsprotokolls, mithilfe der SBF-SEM, ein EM-Datensatz erstellt. Diese Daten wurden dreidimensional rekonstruiert, die sphäroidalen Volumina berechnet und miteinander verglichen.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass bereits nach drei Wochen 0,25%iger Cuprizon-Intoxikation ein akuter, axonaler Schaden in Form von APPA4-positiven Sphäroiden sowie elektronenmikroskopisch sichtbaren Akkumulationen von Zellorganellfragmenten vorhanden war.

Die Volumina der beiden Datensätze nahmen vergleichbare, jedoch nicht exakt gleiche Werte an.

Bei der deskriptiven Analyse der Formen der Sphäroide wurden in beiden Datensätzen die gleichen, räumlichen Strukturen erkannt. Diese waren rundliche, ovale, längliche sowie zusammenhängende Sphäroide mit mindestens zwei Auftreibungen.

In den EM-Versuchstieren zeigten sich deutlich mehr degenerierte Axone als in den Kontrolltieren. Die Versuchstiere wiesen untereinander inhomogene Werte auf.

Die Untersuchungen liefern somit erste Ergebnisse dreidimensionaler Analysen der Sphäroide des akuten, axonalen Schadens in IF- und EM-Daten. Die APPA-4 positiven Sphäroide ähnelten dabei hinsichtlich ihrer Nebenachsen, ihrer Volumina und der Formen den axonalen Auftreibungen, die in den EM-Daten erkennbar waren.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aboul-Enein, F., P. Weiser, R. Hoffberger, H. Lassmann, and M. Bradl. 2006. 'Transient axonal injury in the absence of demyelination: a correlate of clinical disease in acute experimental autoimmune encephalomyelitis', *Acta Neuropathol*, 111: 539-47.
- Alonso, A., and M. A. Hernan. 2008. 'Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review', *Neurology*, 71: 129-35.
- Armstrong, R. C., T. Q. Le, N. C. Flint, A. C. Vana, and Y. X. Zhou. 2006. 'Endogenous cell repair of chronic demyelination', *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 245-56.
- Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid, and K. Rajewsky. 2000. 'Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction', *J Exp Med*, 192: 393-404.
- Barnett, M. H., and J. W. Prineas. 2004. 'Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion', *Ann Neurol*, 55: 458-68.
- Bauer, M., C. Brakebusch, C. Coisne, M. Sixt, H. Wekerle, B. Engelhardt, and R. Fässler. 2009. 'Beta1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 1920-5.
- Bitsch, A., J. Schuchardt, S. Bunkowski, T. Kuhlmann, and W. Bruck. 2000. 'Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation', *Brain*, 123 ( Pt 6): 1174-83.
- Bjartmar, C., R. P. Kinkel, G. Kidd, R. A. Rudick, and B. D. Trapp. 2001. 'Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS', *Neurology*, 57: 1248-52.
- Bjelobaba, I., V. Begovic-Kupresanin, S. Pekovic, and I. Lavrnja. 2018. 'Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis', *J Neurosci Res*, 96: 1021-42.
- Bramlett, H. M., S. Kraydieh, E. J. Green, and W. D. Dietrich. 1997. 'Temporal and regional patterns of axonal damage following traumatic brain injury: a beta-amyloid precursor protein immunocytochemical study in rats', *J Neuropathol Exp Neurol*, 56: 1132-41.
- Bruck, W. 2005. 'The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage', *J Neurol*, 252 Suppl 5: v3-9.
- Cappellano, G., E. Orilieri, C. Comi, A. Chiocchetti, S. Bocca, E. Boggio, I. S. Bernardone, A. Cometa, R. Clementi, N. Barizzone, S. D'Alfonso, L. Corrado, D. Galimberti, E. Scarpini, F. R. Guerini, D. Caputo, D. Paolicelli, M. Trojano, L. Figa-Talamanca, M. Salvetti, F. Perla, M. Leone, F. Monaco, and U. Dianzani. 2008. 'Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis', *Genes Immun*, 9: 438-44.
- Chard, D., and D. Miller. 2009. 'Grey matter pathology in clinically early multiple sclerosis: evidence from magnetic resonance imaging', *J Neurol Sci*, 282: 5-11.
- Chitnis, T., J. Graves, B. Weinstock-Guttman, A. Belman, C. Olsen, M. Misra, G. Aaen, L. Benson, M. Candee, M. Gorman, B. Greenberg, L. Krupp, T. Lotze, S. Mar, J. Ness, J. Rose, J. Rubin, T. Schreiner, J. Tillema, A. Waldman, M. Rodriguez, C. Casper, and E. Waubant. 2016. 'Distinct effects of obesity and puberty on risk and age at onset of pediatric MS', *Ann Clin Transl Neurol*, 3: 897-907.
- Cocks, E., M. Taggart, F. C. Rind, and K. White. 2018. 'A guide to analysis and reconstruction of serial block face scanning electron microscopy data', *J Microsc*, 270: 217-34.
- Crawford, M. P., S. X. Yan, S. B. Ortega, R. S. Mehta, R. E. Hewitt, D. A. Price, P. Stastny, D. C. Douek, R. A. Koup, M. K. Racke, and N. J. Karandikar. 2004. 'High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay', *Blood*, 103: 4222-31.
- Criste, G., B. Trapp, and R. Dutta. 2014. 'Axonal loss in multiple sclerosis: causes and mechanisms', *Handb Clin Neurol*, 122: 101-13.

- Crowther, R. A., L. A. Amos, J. T. Finch, D. J. De Rosier, and A. Klug. 1970. 'Three dimensional reconstructions of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs', *Nature*, 226: 421-5.
- d'Ydewalle, C., J. Krishnan, D. M. Chiheb, P. Van Damme, J. Irobi, A. P. Kozikowski, P. Vanden Berghe, V. Timmerman, W. Robberecht, and L. Van Den Bosch. 2011. 'HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease', *Nat Med*, 17: 968-74.
- Denton, K. R., L. Lei, J. Grenier, V. Rodionov, C. Blackstone, and X. J. Li. 2014. 'Loss of spastin function results in disease-specific axonal defects in human pluripotent stem cell-based models of hereditary spastic paraplegia', *Stem Cells*, 32: 414-23.
- Drexler, B., H. Hentschke, B. Antkowiak, and C. Grasshoff. 2010. 'Organotypic cultures as tools for testing neuroactive drugs - link between in-vitro and in-vivo experiments', *Curr Med Chem*, 17: 4538-50.
- Ferguson, B., M. K. Matyszak, M. M. Esiri, and V. H. Perry. 1997. 'Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions', *Brain*, 120 ( Pt 3): 393-9.
- Fisher, E., J. C. Lee, K. Nakamura, and R. A. Rudick. 2008. 'Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study', *Ann Neurol*, 64: 255-65.
- Frank, J. 1995. 'Approaches to large-scale structures', *Curr Opin Struct Biol*, 5: 194-201.
- Geddes, J. F., G. H. Vowles, T. W. Beer, and D. W. Ellison. 1997. 'The diagnosis of diffuse axonal injury: implications for forensic practice', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23: 339-47.
- 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: 139-44.
- Geurts, J. J., P. K. Stys, A. Minagar, S. Amor, and R. Zivadinov. 2009. 'Gray matter pathology in (chronic) MS: modern views on an early observation', *J Neurol Sci*, 282: 12-20.
- Gold, Ralf. 2012. '„Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose“', Accessed 21.07.2018. <https://www.dgn.org/leitlinien/2333-II-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose>.
- 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: 1610-3.
- Grytten, N., O. Torkildsen, and K. M. Myhr. 2015. 'Time trends in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Norway during eight decades', *Acta Neurol Scand*, 132: 29-36.
- Haines, J. D., M. Inglese, and P. Casaccia. 2011. 'Axonal damage in multiple sclerosis', *Mt Sinai J Med*, 78: 231-43.
- Hares, K., and A. Wilkins. 2017. 'Axonal transport proteins as biomarkers of neurodegeneration?', *Biomark Med*, 11: 589-91.
- Hoflich, K. M., C. Beyer, T. Clarner, C. Schmitz, S. Nyamoya, M. Kipp, and T. Hochstrasser. 2016. 'Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach', *Brain Res*, 1650: 125-33.
- Hoppe, W., and B. Grill. 1977. 'Prospects of three-dimensional high resolution electron microscopy of non-periodic structures', *Ultramicroscopy*, 2: 153-68.
- Huizinga, R., W. Gerritsen, N. Heijmans, and S. Amor. 2008. 'Axonal loss and gray matter pathology as a direct result of autoimmunity to neurofilaments', *Neurobiol Dis*, 32: 461-70.
- Hunter, S. F. 2016. 'Overview and diagnosis of multiple sclerosis', *Am J Manag Care*, 22: s141-50.
- Keegan, B. Mark, and John H. Noseworthy. 2002. 'Multiple Sclerosis', *Annual Review of Medicine*, 53: 285-302.

- Kim, J. Y., S. Shen, K. Dietz, Y. He, O. Howell, R. Reynolds, and P. Casaccia. 2010. 'HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage', *Nat Neurosci*, 13: 180-9.
- Kingwell, E., J. J. Marriott, N. Jette, T. Pringsheim, N. Makhani, S. A. Morrow, J. D. Fisk, C. Evans, S. G. Beland, S. Kulaga, J. Dykeman, C. Wolfson, M. W. Koch, and R. A. Marrie. 2013. 'Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review', *BMC Neurol*, 13: 128.
- Kip, Miriam, Tonio Schönfelder, and Hans-Holger Bleß. 2016. *Weißbuch Multiple Sklerose* (Springer Verlag).
- Kipp, M., T. Clarner, J. Dang, S. Copray, and C. Beyer. 2009a. 'The cuprizone animal model: new insights into an old story', *Acta Neuropathol*, 118: 723-36.
- Kipp, M., S. Nyamoya, T. Hochstrasser, and S. Amor. 2017. 'Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective', *Brain Pathol*, 27: 123-37.
- Kipp, Markus, Tim Clarner, Jon Dang, Sief Copray, and Cordian Beyer. 2009b. 'The cuprizone animal model: new insights into an old story', *Acta Neuropathologica*, 118: 723-36.
- Kornek, B., and H. Lassmann. 1999. 'Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note', *Brain Pathol*, 9: 651-6.
- Kornek, B., M. K. Storch, R. Weissert, E. Wallstroem, A. Stefferl, T. Olsson, C. Lington, M. Schmidbauer, and H. Lassmann. 2000. 'Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions', *Am J Pathol*, 157: 267-76.
- Kuhlmann, T., G. Lingfeld, A. Bitsch, J. Schuchardt, and W. Bruck. 2002. 'Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time', *Brain*, 125: 2202-12.
- Kurtzke, J. F. 1983. 'Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)', *Neurology*, 33: 1444-52.
- 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: 2705-12.
- Lappe-Siefke, C., S. Goebbels, M. Gravel, E. Nicksch, J. Lee, P. E. Braun, I. R. Griffiths, and K. A. Nave. 2003. 'Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination', *Nat Genet*, 33: 366-74.
- Lassmann, H., and M. Bradl. 2017. 'Multiple sclerosis: experimental models and reality', *Acta Neuropathol*, 133: 223-44.
- Lassmann, H., G. Suchanek, and K. Ozawa. 1994. 'Histopathology and the blood-cerebrospinal fluid barrier in multiple sclerosis', *Ann Neurol*, 36 Suppl: S42-6.
- Li, G. L., M. Farooque, A. Holtz, and Y. Olsson. 1995. 'Changes of beta-amyloid precursor protein after compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using immunohistochemistry', *J Neurotrauma*, 12: 269-77.
- Lindner, M., S. Heine, K. Haastert, N. Garde, J. Fokuhl, F. Linsmeier, C. Grothe, W. Baumgartner, and M. Stangel. 2008. 'Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34: 105-14.
- Lublin, F. D., S. C. Reingold, J. A. Cohen, G. R. Cutter, P. S. Sorensen, A. J. Thompson, J. S. Wolinsky, L. J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof, B. Bebo, Jr., P. A. Calabresi, M. Clanet, G. Comi, R. J. Fox, M. S. Freedman, A. D. Goodman, M. Inglese, L. Kappos, B. C. Kieseier, J. A. Lincoln, C. Lubetzki, A. E. Miller, X. Montalban, P. W. O'Connor, J. Petkau, C. Pozzilli, R. A. Rudick, M. P. Sormani, O. Stuve, E. Waubant, and C. H. Polman. 2014. 'Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions', *Neurology*, 83: 278-86.
- 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: 707-17.

- Lucchinetti, CF, and M Rodriguez. 1997. 'The controversy surrounding the pathogenesis of the multiple sclerosis lesion', *Mayo Clin Proc* 1997.
- Ludwin, S. K., and E. S. Johnson. 1981. 'Evidence for a "dying-back" gliopathy in demyelinating disease', *Ann Neurol*, 9: 301-5.
- Magliozzi, R., O. Howell, A. Vora, B. Serafini, R. Nicholas, M. Puopolo, R. Reynolds, and F. Aloisi. 2007. 'Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology', *Brain*, 130: 1089-104.
- Mana, P., S. A. Fordham, M. A. Staykova, M. Correcha, D. Silva, D. O. Willenborg, and D. Linares. 2009. 'Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation', *J Neuroimmunol*, 210: 13-21.
- 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: 107-16.
- Mayr, W. T., S. J. Pittock, R. L. McClelland, N. W. Jorgensen, J. H. Noseworthy, and M. Rodriguez. 2003. 'Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000', *Neurology*, 61: 1373-7.
- McMahon, E. J., K. Suzuki, and G. K. Matsushima. 2002. 'Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier', *J Neuroimmunol*, 130: 32-45.
- Miller, D. H., D. T. Chard, and O. Ciccarelli. 2012. 'Clinically isolated syndromes', *Lancet Neurol*, 11: 157-69.
- Miranda, K., W. Girard-Dias, M. Attias, W. de Souza, and I. Ramos. 2015. 'Three dimensional reconstruction by electron microscopy in the life sciences: An introduction for cell and tissue biologists', *Mol Reprod Dev*, 82: 530-47.
- Morell, P., C. V. Barrett, J. L. Mason, A. D. Toews, J. D. Hostettler, G. W. Knapp, and G. K. Matsushima. 1998. 'Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination', *Mol Cell Neurosci*, 12: 220-7.
- Murray, T. J. 2009. 'The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries', *J Neurol Sci*, 277 Suppl 1: S3-8.
- Nakahara, J., M. Maeda, S. Aiso, and N. Suzuki. 2012. 'Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendroglialopathy', *Clin Rev Allergy Immunol*, 42: 26-34.
- Nave, K. A., and B. D. Trapp. 2008. 'Axon-glia signaling and the glial support of axon function', *Annu Rev Neurosci*, 31: 535-61.
- Nicot, A., P. V. Ratnakar, Y. Ron, C. C. Chen, and S. Elkabes. 2003. 'Regulation of gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis indicates early neuronal dysfunction', *Brain*, 126: 398-412.
- Nikic, I., D. Merkler, C. Sorbara, M. Brinkoetter, M. Kreutzfeldt, F. M. Bareyre, W. Bruck, D. Bishop, T. Misgeld, and M. Kerschensteiner. 2011. 'A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis', *Nat Med*, 17: 495-9.
- Oleszak, E. L., J. R. Chang, H. Friedman, C. D. Katsetos, and C. D. Platsoucas. 2004. 'Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis', *Clin Microbiol Rev*, 17: 174-207.
- Panitch, H., A. Miller, D. Paty, and B. Weinshenker. 2004. 'Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study', *Neurology*, 63: 1788-95.
- Pierce, J. E., J. Q. Trojanowski, D. I. Graham, D. H. Smith, and T. K. McIntosh. 1996. 'Immunohistochemical characterization of alterations in the distribution of amyloid precursor proteins and beta-amyloid peptide after experimental brain injury in the rat', *J Neurosci*, 16: 1083-90.
- Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker, and J. S.

- Wolinsky. 2011. 'Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria', *Ann Neurol*, 69: 292-302.
- Povlishock, J. T. 1992. 'Traumatically induced axonal injury: pathogenesis and pathobiological implications', *Brain Pathol*, 2: 1-12.
- Procaccini, C., V. De Rosa, V. Pucino, L. Formisano, and G. Matarese. 2015. 'Animal models of Multiple Sclerosis', *Eur J Pharmacol*, 759: 182-91.
- Ray, A., S. Basu, C. B. Williams, N. H. Salzman, and B. N. Dittel. 2012. 'A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand', *J Immunol*, 188: 3188-98.
- Robinson, A. P., C. T. Harp, A. Noronha, and S. D. Miller. 2014. 'The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment', *Handb Clin Neurol*, 122: 173-89.
- Rodriguez, M., and B. Scheithauer. 1994. 'Ultrastructure of multiple sclerosis', *Ultrastruct Pathol*, 18: 3-13.
- Schmidt, Rudolf Manfred, and Frank Hoffmann. 2006. „Multiple Sklerose“ (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH).
- Schulz. 2010. „Neurologie...in 5 Tagen“ (Springer Verlag).
- 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: 433-9.
- Singh, S., I. Metz, S. Amor, P. van der Valk, C. Stadelmann, and W. Bruck. 2013. 'Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons', *Acta Neuropathol*, 125: 595-608.
- Skulina, C., S. Schmidt, K. Dornmair, H. Babbe, A. Roers, K. Rajewsky, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and N. Goebels. 2004. 'Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 2428-33.
- Sorbara, C. D., N. E. Wagner, A. Ladwig, I. Nikic, D. Merkler, T. Kleele, P. Marinkovic, R. Naumann, L. Godinho, F. M. Bareyre, D. Bishop, T. Misgeld, and M. Kerschensteiner. 2014. 'Pervasive axonal transport deficits in multiple sclerosis models', *Neuron*, 84: 1183-90.
- Stys, P. K., G. W. Zamponi, J. van Minnen, and J. J. Geurts. 2012. 'Will the real multiple sclerosis please stand up?', *Nat Rev Neurosci*, 13: 507-14.
- Torkildsen, O., L. A. Brunborg, K. M. Myhr, and L. Bo. 2008. 'The cuprizone model for demyelination', *Acta Neurol Scand Suppl*, 188: 72-6.
- Trapp, B. D., and K. A. Nave. 2008. 'Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?', *Annu Rev Neurosci*, 31: 247-69.
- 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: 278-85.
- Trapp, B. D., and P. K. Stys. 2009. 'Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis', *Lancet Neurol*, 8: 280-91.
- Tremlett, H., M. Yousefi, V. Devonshire, P. Rieckmann, and Y. Zhao. 2009. 'Impact of multiple sclerosis relapses on progression diminishes with time', *Neurology*, 73: 1616-23.
- Uschkureit, T., O. Sporkel, J. Stracke, H. Bussow, and W. Stoffel. 2000. 'Early onset of axonal degeneration in double (plp<sup>-/-</sup>-mag<sup>-/-</sup>) and hypomyelination in triple (plp<sup>-/-</sup>-mbp<sup>-/-</sup>-mag<sup>-/-</sup>) mutant mice', *J Neurosci*, 20: 5225-33.
- van den Berg, R., C. C. Hoogenraad, and R. Q. Hintzen. 2017. 'Axonal transport deficits in multiple sclerosis: spiraling into the abyss', *Acta Neuropathol*, 134: 1-14.
- van der Star, B. J., D. Y. Vogel, M. Kipp, F. Puentes, D. Baker, and S. Amor. 2012. 'In vitro and in vivo models of multiple sclerosis', *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11: 570-88.
- Vesterinen, H. M., E. S. Sena, C. French-Constant, A. Williams, S. Chandran, and M. R. Macleod. 2010. 'Improving the translational hit of experimental treatments in multiple sclerosis', *Mult Scler*, 16: 1044-55.

- Vogt, J., F. Paul, O. Aktas, K. Muller-Wielsch, J. Dorr, S. Dorr, B. S. Bharathi, R. Glumm, C. Schmitz, H. Steinbusch, C. S. Raine, M. Tsokos, R. Nitsch, and F. Zipp. 2009. 'Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis', *Ann Neurol*, 66: 310-22.
- von Bernhardi, R., L. E. Bernhardi, and J. Eugénin. 2017. 'What Is Neural Plasticity?', *Adv Exp Med Biol*, 1015: 1-15.
- Watson, D. F., K. P. Fittro, P. N. Hoffman, and J. W. Griffin. 1991. 'Phosphorylation-related immunoreactivity and the rate of transport of neurofilaments in chronic 2,5-hexanedione intoxication', *Brain Res*, 539: 103-9.
- Weinshenker, B. G., B. Bass, G. P. Rice, J. Noseworthy, W. Carriere, J. Baskerville, and G. C. Ebers. 1989. 'The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability', *Brain*, 112 ( Pt 1): 133-46.
- Wiendl, Heinz, and Bernd C Kieseier. 2010. „Multiple Sklerose. Klinik, Diagnostik und Therapie.“ (Kohlhammer: Stuttgart).
- Williamson, T. L., and D. W. Cleveland. 1999. 'Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons', *Nat Neurosci*, 2: 50-6.
- Witte, M. E., L. Bo, R. J. Rodenburg, J. A. Belien, R. Musters, T. Hazes, L. T. Wintjes, J. A. Smeitink, J. J. Geurts, H. E. De Vries, P. van der Valk, and J. van Horssen. 2009. 'Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions', *J Pathol*, 219: 193-204.

## 8. Anhang

### 8.1 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben, herzlichst bedanken.

Den größten Dank darf ich hierbei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp aussprechen, da er mich stets professionell mit Rat und Tat unterstützte. Von Tag eins an begleitete er meine Arbeit durch all ihre Entstehungsphasen, forderte und förderte mich allumfassend und scheute bei der Betreuung keinerlei Mühe und Engagement. Von ganzem Herzen vielen Dank hierfür.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz möchte ich meinen Dank aussprechen, da ich meine Arbeit an seinem Lehrstuhl verfolgen und dabei sein Team und sein Equipment beanspruchen durfte.

Von großer Bedeutung war für mich auch die herzliche und tatkräftige Förderung von Frau Dr. Tanja Hochstrasser, die ich jederzeit für Fragen konsultieren konnte und die mir jederzeit kompetent zur Seite stand.

Außerdem möchte ich all den technischen Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München, insbesondere Frau Beate Aschauer und Frau Astrid Baltruschat, danken. Sie unterstützen mich und andere Doktoranden in liebevoller, geduldiger Art und Weise, und verliehen dem Labor eine sehr angenehme, freundliche und zielstrebige Arbeitsatmosphäre.

Ebenso möchte ich meiner Familie und meinen Freunden herzlichst danken, dass sie mich über die gesamte Dauer der Promotion stets motiviert haben. Hierbei möchte ich meinen besonderen Dank Herrn Markus Lang, Frau Silke Ruppel-Kramer und Frau Gudrun Ruppel aussprechen, sowie Frau Katharina Kramer, Herrn Helmut Ruppel, Herrn Walter Kramer und Herrn Lutz Kramer, die allzeitig so tatkräftig und liebevoll hinter mir standen.

## 8.2 Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Kramer, Franziska

---

Name, Vorname

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

**„Der Vergleich dreidimensionaler Rekonstruktionen des axonalen Schadens im Cuprizon-Modell“**

selbständig 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.

München, den 23.06.21

Franziska Kramer

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand