

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

**Die Expression der neuronalen Gerüstproteine
Ankyrin G und Beta-IV Spektrin
in Multiple Sklerose Mausmodellen**

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

vorgelegt von
Carolin Ertl

aus Altötting

2021

**Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner
PD Dr. Astrid Blaschek

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

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2021

Meine Familie
Meine Freunde

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
II.	EINLEITUNG	9
1.	Multiple Sklerose	9
2.	Verwendete Tiermodelle	15
2.1.	Cuprizone-Modell	15
2.2.	EAE-Modell.....	16
2.3.	Remyelinisierung im MS Modell.....	17
3.	Aufbau und Funktion des ZNS	18
3.1.	Axon Initial Segment und Nodien.....	18
3.2.	Gerüstproteine: Ankyrin G und beta-IV Spektrin	18
3.3.	AIS Plastizität	20
4.	Zielsetzung	22
III.	MATERIAL UND METHODEN	23
1.	Materialien und Geräte	23
2.	Versuchstiere und Krankheitsinduktion	29
3.	Narkose	30
4.	Sensorische Stimulation und Deprivation	30
5.	Gewebeaufarbeitung	31
6.	Immunhistochemie	32
6.1.	Prinzip der Immunhistochemie	32
6.2.	IHC-Färbung.....	33
7.	Immunfluoreszenzfärbung	38
7.1.	Prinzip der Immunfluoreszenz	38
7.2.	IF-Färbung	38
8.	Auswertung	41
8.1.	Auswertung der IHC-Färbung	41
8.2.	Auswertung der IF-Färbung.....	42
8.3.	Statistische Auswertung	45

IV.	ERGEBNISSE	46
1.	Ankyrin G-Expression im Cuprizone-Modell	46
1.1.	Verminderte Ankyrin G-Expression im medialen Corpus Callosum bei fortlaufend Cuprizone-induzierter Demyelinisierung	46
1.2.	Ankyrin G-Expression im medialen Corpus Callosum nach Remyelinisierung....	54
2.	Beta-IV Spektrin-Expression im Cuprizone-und EAE-Modell	59
2.1.	Keine Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression bei Cuprizone-induzierter Demyelinisierung und sensorischer Stimulation.....	59
2.2.	Keine Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression nach aktiver EAE- Immunisierung und sensorischer Stimulation.....	59
2.3.	Erhöhte beta-IV Spektrin-Expression bei Cuprizone-induzierter Demyelinisierung und sensorischer Deprivation.....	60
2.4.	Keine Veränderung der beta-IV Spektrin Expression nach aktiver EAE- Immunisierung und sensorischer Deprivation	60
V.	DISKUSSION	63
1.	Die Rolle von Ankyrin G bei neurodegenerativen Prozessen des ZNS.....	63
2.	Ist Ankyrin G relevant für die Remyelinisierung?.....	66
3.	Der Einfluss der sensorischen Stimulation und Deprivation auf beta-IV Spektrin im Cuprizone- und EAE-Modell.....	68
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	71
VII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS.....	73
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	74
X.	ANHANG.....	79
1.	Transkardiale Perfusion und Paraffineinbettung	79
2.	Transkardiale Perfusion und Kryokonservierung.....	81
XI.	DANKSAGUNG	83
XII.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	84

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
AIS	Axon Initial Segment
Ank B	Ankyrin B
Ank G	Ankyrin G
Ank R	Ankyrin R
Anti	gegen
AP	Aktionspotential
APP	engl. Amyloid Precursor Protein
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BDNF	engl. Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca.	circa
CC	Corpus Callosum
CD	cluster of differentiation
Co	Kontrolle (engl. Control)
CWFS	engl. Cold Water Fish Gelatine
Cup	Cuprizone
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMT	engl. Disease Modifying Therapy
dt.	deutsch
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	et alia
FA	Freund-Adjuvans
g	Gramm
GFAP	engl. Glial Fibrillary Acidic Protein
H&E-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIER	heat induced epitope retrieval
HHV	humanes Herpesvirus
HHV-4	humanes Herpesvirus Typ 4

HHV-6A	humanes Herpesvirus Typ 6A
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase
IBA1	engl. Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule1
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
KCNQ2	engl. potassium channel, voltage gated, KQT-like subfamily, member 2
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
l	Liter
LFB	engl. Luxol Fast Blue
MBP	Basisches Myelinprotein
mg	Milligramm
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	Minute
ml	Milliliter
MOG ₃₅₋₅₅	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein ₃₅₋₅₅
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NF186	Neurofascin-186
Nrf2	engl. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OLIG2	Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2
OP-Besteck	Operationsbesteck
OT	Objektträger
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	engl. Platelet-derived growth factor
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoff-Ionen
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
pScx	Primär somatosensorischer Kortex
PTX	Pertussis Toxin
ROI	engl. region of interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SEM	Standard Error of the Mean

S1P1	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TH ₁	Typ-1 T-Helferzelle
ZNS	Zentralnervensystem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

II. EINLEITUNG

1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (Enzephalomyelitis disseminata, MS) ist eine chronische, entzündlich-degenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Es kommt sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark zu fokaler Entmarkung (Demyelinisierung) (Alastair Compston, 2006).

Zu den klassischen Symptomen der MS zählen Sehstörungen, Gangstörungen, Fatigue (generalisierte Erschöpfung) und Missempfindungen an Extremitäten und Rumpf (Olek, 2016). Die Art und Stärke der klinischen Symptome ist abhängig von der Lokalisation der demyelinisierten Läsionen im ZNS.

Die Prävalenz der MS ist weltweit verschieden. In Europa und Nordamerika sind ca. 150 von 100.000 Einwohnern betroffen (Prävalenz: 0,15%). Im Vergleich dazu liegt die Prävalenz in der restlichen Welt bei weniger als 0,03%. Mehr als die Hälfte der Erkrankten sind junge Frauen. Das typische Erkrankungsalter liegt dabei zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Kipp & Beyer, 2009; Leray, Moreau, Fromont, & Edan, 2016; Stys, Zamponi, van Minnen, & Geurts, 2012).

Die Erkrankung wurde im 19. Jahrhundert von Robert Carswell und Jean Curveilhier erstmals nachgewiesen. Beide waren angesehene Professoren der pathologischen Anatomie und beschrieben zeitgleich um 1838 MS-typische Herde im Rückenmark und dem Hirnstamm. 1849 veröffentlichte der deutsche Internist Friedrich von Frerichs seine Arbeit über die „Diagnose Hirnsclerose“. Dennoch war Frerichs Beitrag über die klinischen und pathologischen Befunde der MS vorerst umstritten. Die MS wurde erst 1868 als eigenständige Krankheit anerkannt, als der französische Neurologe Jean-Martin Charcot die diagnostischen Kriterien der MS, die sogenannten „Charcot-Trias“ (Nystagmus, Intentionstremor und Dysarthrie (Skandierende Sprache)), definierte. In seiner Abhandlung über die „Histologie de la Sclérose en plaque“ gelang ihm erstmals die Beschreibung der MS-typischen Läsionen und die Abgrenzung gegenüber anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson (Alastair Compston, 2006; Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft, 2019).

Der klinische Verlauf der MS kann sehr variabel sein (siehe Abbildung 1). Grundsätzlich unterscheidet man vier verschiedene Formen: das klinisch isolierte Syndrom (KIS), die primär progrediente MS (PPMS), die sekundär progrediente MS (SPMS) und die schubförmig remittierende MS (RRMS).

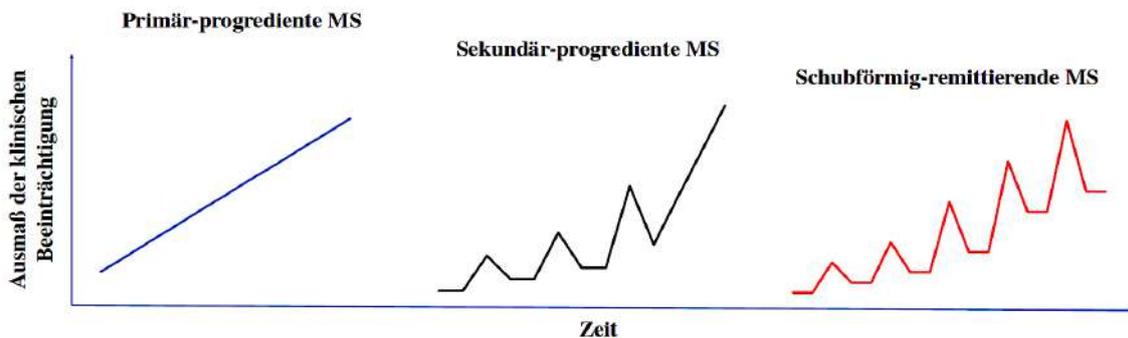


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

Die Erstmanifestation der MS kann mit unterschiedlichen Symptomen einhergehen. Am häufigsten sind plötzlich eintretende Sehstörungen und Parästhesien.

Das klinisch isolierte Syndrom (KIS) bezeichnet die erste klinische Manifestation eines MS-typischen Symptoms und einer in der Magnetresonanztomographie (MRT) erkennbaren MS-typischen Läsion. Anhand der 2017 überarbeiteten McDonald Diagnose-Kriterien kann beurteilt werden, ob zu diesem frühen Zeitpunkt eine MS vorliegt. Für die Diagnosestellung ist entscheidend, dass eine räumliche und zeitliche Dissemination der MRT-Läsionen besteht (Thompson et al., 2018). Zu dem Zeitpunkt des KIS sind die Kriterien der MS nach McDonald aufgrund der fehlenden zeitlichen Dissemination noch nicht vollständig erfüllt (Mattle & Mumenthaler, 2002; Schnurbus R., 2018).

Bei 85% der Patienten wird bei der Erstdiagnose die schubförmig remittierende MS (RRMS) festgestellt. Ein Schub wird als eine neu aufgetretene, mindestens 30 Tage vom vorherigen Schub zeitlich abgrenzbare MS-typische Symptomatik beschrieben und verläuft über Tage oder Wochen (Bender, 2015). Die einzelnen neurologischen Ausfälle, die während eines Schubes auftreten, können sich anschließend vollständig oder unvollständig zurückbilden. Das Ausmaß der Behinderung eines Patienten bleibt zwischen zwei Schüben gleich (Plateauphasen). Die RRMS geht unbehandelt bei 80% der Erkrankten in den sekundär chronisch progredienten Verlauf (SPMS) über. Nach dem primär schubförmigen Verlauf kommt es zu einer progredienten Zunahme der neuronalen Störung. Die primär progrediente MS (PPMS) betrifft ca. 15% der MS Patienten. Bei dieser Verlaufsform sind keine Schübe voneinander abgrenzbar und der Zustand des Patienten verschlechtert sich kontinuierlich vom Beginn der Erkrankung (Keegan & Noseworthy, 2002).

Die Ursache für das Auftreten der MS ist bislang ungeklärt. Man geht jedoch davon aus, dass sowohl genetische, als auch Umweltfaktoren zur Entwicklung der Krankheit beitragen.

Bestimmte Humane Histokompatibilitätsantigen-Allele (engl. „human leukocyte antigen“ (HLA)), wie z.B. das HLA-DRB1*1501 Allel, sind mit einem erhöhten Risiko für MS assoziiert (Barcellos et al., 2006). Eine genetische Prädisposition kann das Auftreten der MS ebenfalls erhöhen, ist aber nicht der einzige Grund für die Entstehung der Erkrankung. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei eineiigen Zwillingen beide Kinder erkranken, liegt bei 25-30%, bei zweieiigen Zwillingen nur noch bei 3-5% (Keegan & Noseworthy, 2002; Pröbstl, 2018).

Zu den Umweltfaktoren zählen eine geringe UV-Exposition, Infektionen mit Darmbakterien oder humanen Herpesviren (HHV) und Nikotin-Konsum. In Studien über eine erhöhte Sonnenlichtexposition während der Kindheit wurde gezeigt, dass diese das Risiko für die Entwicklung von MS senkt (Islam, Gauderman, Cozen, & Mack, 2007). Dementsprechend geht ein dauerhaft erhöhter Vitamin-D Spiegel mit einem geringeren Risiko für MS einher (Grant, 2006; Munger, Levin, Hollis, Howard, & Ascherio, 2006). Die Infektion mit HHV, wie dem Epstein-Barr-Virus (EBV bzw. HHV-4) oder dem HHV-6A, stellen laut der „Infektionstheorie“ ein erhöhtes Risiko für die MS dar. Der Großteil der Patienten mit MS ist seropositiv für EBV. Die weltweite Durchseuchungsrate von EBV bei den über 30-Jährigen beträgt 80-95%. Das Risiko zu erkranken, erhöht sich bei einer symptomatischen Infektion oder bei einem erhöhten anti-EBV Antikörper Titer (Ascherio & Munger, 2010; Ascherio et al., 2001; Fraser, Haire, Millar, & McCrea, 1979; Sumaya, Myers, Ellison, & Ench, 1985).

Prognostisch günstige Faktoren, die den Verlauf der MS beeinflussen sind: ein monosymptomatischer Beginn am besten vor dem 35. Lebensjahr, eine kurze Schubdauer, eine schnelle und vor allem vollständige Symptomrückbildung nach einem Schub, rein sensible Symptome und eine erhaltene Gehfähigkeit (Schnurbus R., 2018).

Die Behandlung der MS beinhaltet nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie drei verschiedene Therapieansätze: die Schubtherapie, die verlaufsmodifizierende Therapie und die symptomatische Therapie (Montalban et al., 2018). Das Mittel der ersten Wahl in der Schubtherapie ist ein Glukokortikoid, z.B. Methylprednisolon. Diese wirken antiphlogistisch bzw. antiinflammatorisch und immunsuppressiv. Die Entzündungsreaktion im ZNS wird reduziert, wodurch die Symptome des Patienten verbessert werden können. Eine weitere Therapieoption im akuten Schub ist die Plasmapherese. Dabei wird das Blut des Patienten von pathogenen Bestandteilen, wie z.B. übermäßig produzierten Antikörper gereinigt. Die verlaufsmodifizierende Therapie umfasst je nach Form und Verlauf der MS unterschiedliche Medikamente. Dazu gehören z.B. Beta-Interferone, Glatirameracetat,

Fingolimod und diverse Antikörper, wie Alemtuzumab, Natalizumab und Ocrelizumab. Diese werden als sogenannte engl. „disease modifying therapy“ (DMT) zusammengefasst und sind besonders für Patienten mit RRMS wichtig (Montalban et al., 2018). Die Immunmodulatoren reduzieren die Anzahl und den Schweregrad der Schübe, vermindern das Auftreten neuer Läsionen im ZNS und verlangsamen das Fortschreiten der Behinderung (Mattle & Mumenthaler, 2002). Die symptomatische Therapie der MS umfasst sowohl medikamentöse und als auch verschiedene alternative Heilmethoden, wie z.B. Massagen, Akupunktur oder Ernährungstherapien. Diese Maßnahmen dienen begleitend zur Schub- und verlaufsmodifizierenden Therapie der Behandlung von Mobilitätseinschränkungen, vegetativen Symptomen und Depressionen. Insgesamt soll eine Verbesserung der Lebensqualität des Patienten erreicht werden.

Schubtherapie	
Allgemein	1. Wahl: Glukokortikoid (Methylprednisolon) 2. Wahl: Plasmaseparation
Verlaufs-modifizierende Therapie	
Klinisch isoliertes Syndrom (KIS)	- Glatirameacetat - Interferon-beta _{1a} intramuskulär (i.m.) - Interferon-beta _{1a} subkutan (s.c.) - Interferon-beta _{1b} s.c.
Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (MS)	Milder Verlauf: - Dimethylfumarat - Glatirameacetat - Interferon- beta _{1a} i.m. - Interferon-beta _{1a} s.c. - Interferon-beta _{1b} s.c. - PEG Interferon-beta _{1a} s.c. - Teriflunomid Hochaktiver Verlauf: 1. Wahl: - Alemtuzumab - Cladribin - Fingolimod - Natalizumab - Ocrelizumab 2. Wahl: - Mitoxantron
Sekundär progrediente MS	Mit aufgesetzten Schüben: - Interferon-beta _{1a} s.c. - Interferon-beta _{1b} s.c. - Mitoxantron Ohne aufgesetzte Schübe: - Mitoxantron
Primär Progrediente MS	- Ocrelizumab

Tabelle 1: Stufentherapie der Multiplen Sklerose
(nach der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2014)

Substanz	Wirkmechanismus	Darreichungsform
Alemtuzumab	Antikörper gegen CD52 (Oberflächenantigen der B- und T-Lymphozyten)	intravenös (i.v.)
Azathioprin (6-Mercaptopurin)	Purin-Analogon (Verminderung der Lymphozytenproliferation)	per os (p.o.)
Beta-Interferon	Immunmodulator (Verminderung der Entzündungsreaktion, Hemmung der Lymphozyten)	- Interferon-beta _{1a} intramuskulär (i.m.) - Interferon-beta _{1a} subkutan (s.c.) - Interferon-beta _{1b} s.c. - PEG-Interferon-beta _{1a} s.c.
Cladribin	Purin-Analogon (Verminderung der Lymphozytenzellproliferation)	p.o.
Dimethylfumarat	Immunmodulator und Antioxidans (Aktivierung des engl. „Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2“ (Nrf2)-Signalwegs: Transkriptionsfaktor für antiinflammatorisch und antioxidativ wirkende Genprodukte)	p.o.
Fingolimod	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1P1)-Modulator (Verminderung der Lymphozytenzellmigration und -proliferation)	p.o.
Glatirameacetat	Immunmodulator (Peptidgemisch aus vier Aminosäuren: Glutaminsäure, Lysin, Alanin, Tyrosin)	s.c.
Mitoxantron	Interkalation von DNA-Strängen (Verminderung der Lymphozyten- und Makrophagenproliferation)	i.v.
Natalizumab	Antikörper gegen alpha 4-Integrin (Verminderung der Lymphozytenzellmigration)	i.v.

Ocrelizumab	Antikörper gegen CD20 (Verminderung der CD20-positiven B-Zellen)	i.v.
Ofatumumab	Antikörper gegen CD20 (Verminderung der CD20-positiven B-Zellen)	i.v.
Teriflunomid	Hemmung der Dihydroorotat-Dehydrogenase (Verminderung der Lymphozytenzellproliferation)	p.o.

Table 2: Zugelassene Wirkstoffe in der Therapie der Multiplen Sklerose (nach der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2014)

2. Verwendete Tiermodelle

Bei der MS handelt es sich um eine neurologische Erkrankung, die auf Demyelinisierung, axonaler Degeneration, Verlust von Oligodendrozyten, Gliose und Aktivierung von peripheren Immunzellen beruht. Es wurden verschiedene experimentelle Tiermodelle entwickelt, die die grundlegenden Mechanismen der MS darstellen sollen. Die Demyelinisierung im ZNS wird dabei durch chemische Noxen oder durch die Immunisierung mit verschiedenen ZNS Proteinen induziert. Man unterscheidet dabei das toxische „Cuprizone-Tiermodell“ und das immunvermittelte „Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis“ (EAE)-Tiermodell.

2.1. Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Modell ist ein Modell der toxischen Demyelinisierung im ZNS (Kipp, Clarner, Dang, Copray, & Beyer, 2009). Der Kupfer-Chelator Cuprizone, auch *Bis(cyclohexanone)-oxaldihydrazone* genannt, verursacht eine reproduzierbare Demyelinisierung in verschiedenen ZNS Arealen unter anderem dem medialen Corpus Callosum (CC) (Hirshman et al., 1998). Diese wird durch die Zugabe von 0,2-0,25% Cuprizone zum Normalfutter der Versuchstiere induziert.

Die Ursache der schädigenden Wirkung von Cuprizone liegt in der Beeinträchtigung des mitochondrialen Stoffwechsels und der Zellatmung. Durch die Schädigung beteiligter Enzymkomplexe (z.B. der Cytochrom-c-Oxidase), die Kupfer als Cofaktor benötigen, kommt es zu einer pH-Wert Änderung im Gehirn. Die Störung der Atmungskette führt zu einer verminderten Produktion von Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) und dadurch zu einem erheblichen Energiemangel. Dies führt zur T-Zell unabhängigen Apoptose der

Oligodendrozyten und Demyelinisierung im ZNS. Zudem wird die Bildung von Sauerstoffradikalen (engl. „reactive oxidative species“ (ROS)) gesteigert (Faizi et al., 2016). Der zerebrale pH-Wert fällt in den sauren Bereich (Azidose). Die Folgen davon sind oxidativer Stress, die Schädigung von Oligodendrozyten und die Aktivierung von Makrophagen (Mikroglia) und Astrozyten (Draheim et al., 2016; Kipp, Nyamoya, Hochstrasser, & Amor, 2017; Scheld et al., 2019).

Die Auswirkungen der Cuprizone Behandlung sind vor allem im medialen CC gut zu erkennen. Das CC, auch Commissura magna oder Balken genannt, ist eine quer verlaufende Verbindung zwischen den beiden Großhirnhemisphären. Diese Region ist ein wichtiger Bestandteil der weißen Substanz. Sie wird zum Großteil von myelinisierten Fasern gebildet und dient der Informationsübertragung zwischen der rechten und linken Gehirnhälfte (Buschmann et al., 2012).

Man spricht von einer „akuten Demyelinisierung“, wenn das mediale CC nach einer 5-wöchigen Gabe von Cuprizone nachweislich fast vollständig demyelinisiert ist (Kipp et al., 2009). Es kann zu einer Phase der spontanen Remyelinisierung des medialen CC kommen, wenn die Fütterung von Cuprizone beispielsweise nach 5 bis 6 Wochen abgesetzt und für weitere 2 bis 3 Wochen mit normalem Kraftfutter fortgesetzt wird. Von der „chronischen Demyelinisierung“ (Kipp et al., 2009) wird gesprochen, wenn die Behandlung mit Cuprizone über 12-13 Wochen andauert. Remyelinisierungsprozesse sind zu diesem Zeitpunkt kaum noch erkennbar.

2.2. EAE-Modell

Das EAE-Modell dient ebenso wie das Cuprizone-Modell der Erforschung neuroinflammatorischer Erkrankungen und der Entwicklung neuer Therapieansätze der MS (Baxter, 2007; Kipp et al., 2017).

Die Immunantwort im EAE-Modell ist T-Zell-abhängig. Durch die Immunisierung mit verschiedenen Proteinen, wie dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), dem engl. „Myelin basic protein“ (MBP) oder dem Proteolipid-Protein (PLP) und dem Pertussis Toxin (PTX) wird eine Autoimmunreaktion induziert (Kipp et al., 2009). Die Proteine sind selbst Bestandteile der Myelinhülle. Die Antigene werden lokal am Injektionsort von Antigen-präsentierenden Zellen, wie z.B. der epidermalen Langerhans-Zelle, phagozytiert. In regionären Lymphknoten und der Milz werden die Peptidfragmente über MHC II (engl. „Major histocompatibility complex II“) den CD4⁺-Zellen präsentiert und die Bildung von TH₁- und TH₁₇- Zellen induziert. Die CD4⁺ T-Zellen sind gegen die Myelinproteine MBP, MOG und PLP gerichtet (Segal, 2003). Nach Übertritt über die Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke bewirken die TH₁-Zellen entzündliche Prozesse im Rückenmark, Kleinhirn und Nervus opticus (Baker et al., 1990; O'Neill et al., 1998). Der Anstieg der lymphozytären Infiltrate korreliert mit dem

klinischen Verlauf der Erkrankung. Während der akuten Phase der Paralyse erreicht die Anzahl der T-Zellen den Höhepunkt und fällt mit der Remission der Erkrankung (Allen, Baker, O'Neill, Davison, & Turk, 1993). Die von TH₁-Zellen sezernierten Zytokine führen sowohl direkt zu einer Schädigung von Oligodendrozyten, als auch zu einer Aktivierung von Mikroglia. Diese bilden Sauerstoffradikale, die ebenfalls die Apoptose der Oligodendrozyten induzieren (Segal, 2003).

2.3. Remyelinisierung im MS Modell

Eine ausreichende Myelinisierung der Axone ist wichtig für die Funktionsfähigkeit des ZNS, eine schnelle Signalübertragung und den Schutz vor Neurodegeneration durch schädliche metabolische Faktoren. Im peripheren Nervensystem (PNS) werden die Axone von Schwann Zellen umhüllt, im ZNS von Oligodendrozyten. Insgesamt bezeichnet die Remyelinisierung die Regeneration der Myelinhülle nach der Schädigung durch neurodegenerative oder chronisch-inflammatorische Prozesse, wie sie im Rahmen der MS-Pathogenese vorkommen können (Bruce, Zhao, & Franklin, 2010; Honmou, Felts, Waxman, & Kocsis, 1996; Moore et al., 2013; Schampel et al., 2017).

Die zentralen Mechanismen, die der Remyelinisierung zugrunde liegen, werden am Cuprizone-Modell untersucht. Die Gabe von Cuprizone induziert primär eine zentrale Demyelinisierung. Die spontanen Reparaturvorgänge im Rahmen der Remyelinisierung können nach Absetzen des Kupfer-Chelators und dem Ausbleiben der toxischen Wirkung dargestellt werden.

Die Remyelinisierung verläuft in mehreren Schritten und kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein (Patrikios et al., 2006): 1. Aktivierung und Proliferation der Oligodendrozyten Vorläuferzellen, 2. Migration der Vorläuferzellen zum demyelinisierten Axon, 3. Verbindung der Vorläuferzellen mit dem Axon und 4. Differenzierung zu ausgereiften Oligodendrozyten und Remyelinisierung.

Zudem sind an der Remyelinisierung Astrozyten, Mikrogliazellen und eingewanderte Leukozyten beteiligt. Faktoren, wie der TNF α und das Interleukin β 1 (Arnett et al., 2001; Mason, Suzuki, Chaplin, & Matsushima, 2001) begünstigen den Remyelinisierungsprozess. Im Gegensatz dazu führen Ablagerungen des MBP (Kotter, Li, Zhao, & Franklin, 2006) und der Hyaluronsäure, ein Bestandteil der Extrazellulärmatrix (Back et al., 2005), zu einer weniger stark ausgeprägten Remyelinisierung. Es ist bisher ungeklärt, ob mehr das Ausbleiben von protektiven oder das Vorhandensein von schädigenden Faktoren die Regenerationsfähigkeit der Myelinhülle des Axons beeinflussen.

3. Aufbau und Funktion des ZNS

3.1. Axon Initial Segment und Nodien

Die Nervenzelle (Neuron) besteht aus dem Zellkörper und den Zellfortsätzen. Es gehen zwei Arten von Zellfortsätzen am Soma ab: die Dendriten, die die Signale vorgeschalteter Neurone aufnehmen, und das Axon, das die eingehenden Signale weiterleitet. Am Beginn des Axons liegen der Axonhügel und das Axon Initial Segment (AIS). Hier werden die eingehenden exzitatorischen (erregenden) und inhibitorischen (hemmenden) Signale summiert und das Aktionspotential (AP) wird nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ausgelöst. Das AP wird dann orthograd bis zur endständigen Synapse fortgeleitet, wo es entweder in ein exzitatorisches oder inhibitorisches postsynaptisches Potential übersetzt wird.

Ein zentrales Element in der Signalübertragung entlang des Axons sind neben dem AIS die Ranvier-Schnürringe (lat. Singular: *nodium*, Plural: *nodien*). Sie sind wichtig für die sog. „Saltatorische Erregungsleitung“, die eine sprunghafte, sehr schnelle Erregungsweiterleitung von Ranvier-Schnürring zu Ranvier-Schnürring beschreibt (Huxley & Stampfli, 1949). Das AIS und die Ranvier-Schnürringe sind nicht von einer Myelinhülle umgeben (Brock, Coombs, & Eccles, 1953; Palmer & Stuart, 2006). Beide weisen eine hohe Dichte an spannungsgesteuerten Ionenkanälen auf, die durch die Gerüstproteine Ankyrin G und beta-IV Spektrin im axonalen Zytoskelett verankert werden (Goldberg et al., 2008; Hu et al., 2009; Kole & Stuart, 2012).

3.2. Gerüstproteine: Ankyrin G und beta-IV Spektrin

Die Gerüstproteine Ankyrin und Spektrin sind wesentliche Bestandteile des Zytoskeletts verschiedener Zellen. Sie dienen der Stabilisierung der Zellmembran in Erythrozyten, Nerven- und Muskelzellen. Die Unterformen Ankyrin G und beta-IV Spektrin werden vor allem im Zytoskelett der myelinisierten Axonen exprimiert (Nelson & Jenkins, 2017). Diverse Ionenkanäle, wie der Na_v^+ -Kanal und der KCNQ2 (engl. „potassium channel, voltage gated, KQT-like subfamily, member 2) werden durch Ankyrin G am Ranvier-Schnürring (lat. Singular: *nodium*, Plural: *nodien*) und dem AIS verankert. Dadurch ist Ankyrin G indirekt an der Bildung und Weitergabe von APs beteiligt (Barry et al., 2014; Zhou et al., 1998).

Der Ankyrin-Komplex wird aus Ankyrin G, B und R gebildet. Die drei Proteine werden durch die Gene ANK1 (Ankyrin R), ANK2 (Ankyrin B) und ANK3 (Ankyrin G) kodiert. Die einzelnen Isoformen werden anhand der C- und N-terminalen Aminosäuresequenz, sowie der Spektrin bindenden Domäne unterschieden. Ankyrin G wird am AIS über intrinsische neuronale Mechanismen, am Ranvier-Schnürring über extrinsische Strukturen mit Beteiligung von Neurofascin-186 verankert (Dzhashiashvili et al., 2007; Ho et al., 2014). Das Protein beta-IV Spektrin verbindet Ankyrin G und die gebundenen

Membranproteinen mit dem Aktin-Skelett. Beta-IV Spektrin ist dadurch ebenfalls an der Verankerung von Ionenkanälen im axonalen Zytoskelett beteiligt und stellt zusammen mit Ankyrin G ein wichtiges Element der Signalübertragung im ZNS dar.

Studien zur Expression von Ankyrin G und beta-IV Spektrin an den Ranvier-Schnürringen und dem AIS deuten bereits auf eine zentrale Rolle der Gerüstproteine im ZNS hin. Neben der Stabilisierung der neuronalen Zytoskeletts, werden die Gerüstproteine z.B. bei intraaxonalen Transportprozessen oder im Rahmen der Reifung von Ranvier-Schnürringen exprimiert (Barry et al., 2014; Lacas-Gervais et al., 2004; Saifetiarova, Taylor, & Bhat, 2017). Der Einfluss auf die Expression der Gerüstproteine bei neurodegenerativen Prozessen der MS wurde in den bereits veröffentlichten Studien noch nicht ausreichend untersucht. Wie sich die Expression des Gerüstproteins Ankyrin G an den Ranvier-Schnürringen in akut demyelinisierten Läsionen speziell in der frühen Phase der MS-Pathogenese verändert, möchte ich im Rahmen meiner Untersuchungen am Cuprizone-Modell zeigen.

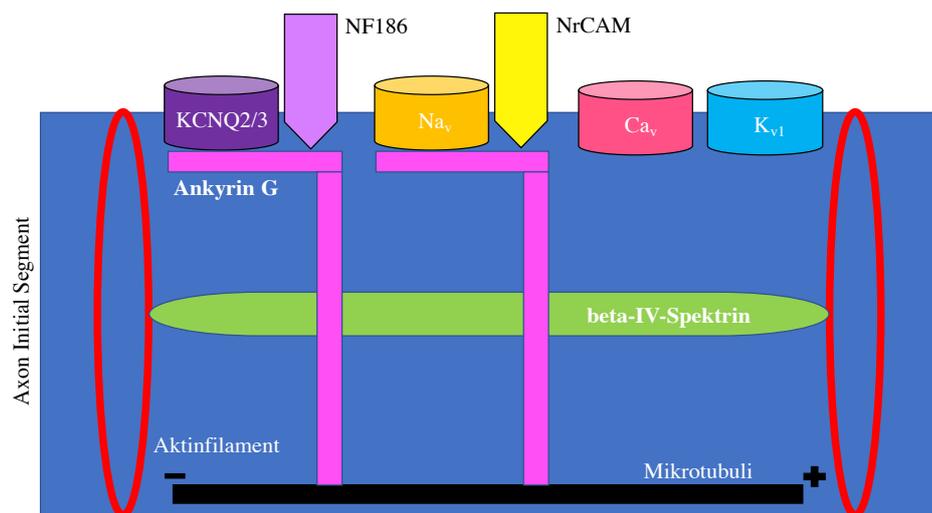


Abbildung 2: Schematische Darstellung der somatodendritischen Domäne des Neurons.

3.3. AIS Plastizität

Der somatosensorische Kortex ist der Teil des ZNS, der die verschiedenen Sinneseindrücke der Außen- und Eigenwahrnehmung des Körpers verarbeitet. Die Informationen der Extero- (Schmerz, Temperatur und Berührung) und der Propriozeptoren (Lage des Körpers im Raum) gelangen über verschiedene Rückenmarksbahnen und Teile des Gehirns zum somatosensorischen Kortex (Mumenthaler, 2002).

Die Entwicklung, das Verhalten und die Umgebung beeinflussen die Reifung des somatosensorischen Kortex. Die dynamischen Veränderungen, die dabei stattfinden, können unter dem Begriff der „Plastizität“ zusammengefasst werden (Berlucchi & Buchtel, 2009; Buchtel, 1978; Konorski, 1948). Genauer gesagt, versteht man unter der Plastizität die Entwicklung und Verbesserung eines Systems abhängig von der jeweiligen Funktion.

Die neuronale Plastizität kann sich auf unterschiedliche Weise und verschiedene Bereiche des ZNS auswirken. Dabei können sich die Struktur und die Funktion der Bestandteile des neuronalen Systems verändern. Es kann z.B. zu einer Zu- bzw. Abnahme der Dornfortsätze am Dendritenbaum, der Synapsen oder der Ionenkanäle entlang des Axons kommen (Turrigiano & Nelson, 2004).

Die neuronale Plastizität kann durch die sensorische Stimulation und Deprivation beeinflusst werden. Sensorische Deprivation bedeutet den vollständigen Entzug von Sinneseindrücken oder einer bestimmten Sinnesmodalität. Fehlende sensorische Reize können dazu führen, dass die Reizantwort im ZNS verstärkt wird, um die Funktion des sensorischen Systems aufrechtzuhalten. Dabei können Neurone auch reaktiviert und unspezifische Areale der Großhirnrinde in die Signalverarbeitung mit einbezogen werden (Wilson, 1991). Im Gegensatz dazu führt die übermäßige Stimulation des sensorischen Systems von außen (z.B. helles Licht) zu einer Verminderung der Reizantwort im ZNS, wodurch die Zellen für den betreffenden Reiz weniger empfindlich werden.

Das AIS ist eine hochspezialisierte, dynamische Struktur des somatosensorischen Systems, die im Rahmen der neuronalen Plastizität verändert werden kann. Dabei kann das AP in Abhängigkeit von der Aktivität der vorgeschalteten Neurone am AIS moduliert werden. Diese Funktion des AIS wird durch den Einbau von Ionenkanälen, der je nach Signalstärke zu- oder abnimmt, möglich (K. J. Bender & Trussell, 2012; Brock et al., 1953; Coombs, Curtis, & Eccles, 1957). Die Anzahl der Ionenkanäle und die Expression der beteiligten Gerüstproteine korreliert dabei mit der Länge des AIS. Anhand der anti-beta-IV Spektrin immunhistochemischen Färbung kann die Länge des AIS berechnet und die Plastizität des AIS nachgewiesen werden.

Inwiefern sich das AIS im Rahmen der neuronalen Plastizität verändert, habe ich anhand des Tastempfindens im sog. engl. „whisker-to-barrel cortex-pathway“ (engl. “whisker”/ lat. “vibrissae”=dt. Tasthaar; engl. “barrel cortex”=dt. „Fasskortex“, oder: „Tasthaar-Fasskortex-Signalweg“) untersucht. Der Fasskortex ist die Region des somatosensorischen Kortex, zu der die Signale der Tasthaare projiziert werden. Jedes „Fass“ repräsentiert dabei ein Tasthaar. Die Folgen der sensorischen Deprivation und der Stimulation der Tasthaare sind in dieser Region am deutlichsten erkennbar (Diamond, Armstrong-James, & Ebner, 1993; Glazewski, 1998). Im verwendeten Tiermodell wird die sensorische Deprivation durch die Unterdrückung des Tastempfindens der Maus realisiert. Dazu werden alle Tasthaare (lat. *vibrissae*) am Kopf der Maus gekürzt, das bedeutet den fast vollständigen Entzug des Tastsinns. Im Gegensatz dazu werden für die übermäßig sensorische Reizung die Tasthaare der Maus stimuliert.

Studien der Arbeitsgruppe Engelhardt zufolge, die sich bereits mit der dynamischen Entwicklung des AIS im engl. „whisker-to-barrel cortex-pathway“ auseinandergesetzt hat, führen die sensorische Deprivation zum Einbau von Ionenkanälen und der Verlängerung des AIS (Jamann, Jordan, & Engelhardt, 2018). Die übermäßige sensorische Stimulation induziert eine signifikante Verkürzung des AIS (Jamann et al., 2018). Fokus meiner Dissertationsarbeit ist es, die neuronale Plastizität des AIS im Rahmen der beiden MS-Tiermodelle zu untersuchen und zu überprüfen, ob die aktivitätsabhängigen Veränderungen der AIS Länge auch im Cuprizone- und EAE-Modell bestehen.

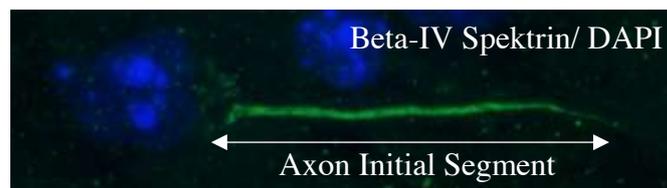


Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis von beta-IV Spektrin im somatosensorischen Kortex

4. Zielsetzung

Die Gerüstproteine Ankyrin G und beta-IV Spektrin werden als wichtige Bestandteile des ZNS an den Ranvier-Schnürringen und dem AIS exprimiert. Vor allem das AIS kann im Rahmen der neuronalen Plastizität verändert werden. In Abhängigkeit von der Aktivität der umgebenden Strukturen im Reizleitungssystem, wie z.B. bei sensorischer Stimulation und Deprivation, ändert sich die Länge des AIS und die Expression der Gerüstproteine, die an der Verankerung der Ionenkanäle am AIS beteiligt sind (Jamann et al., 2018). Die Expression von Ankyrin G und beta-IV Spektrin während der neurodegenerativen und autoimmunvermittelten Prozesse der MS wurde bisher noch nicht ausreichend geklärt.

Zur experimentellen Untersuchung der MS werden vor allem zwei etablierte Tiermodelle verwendet, die jeweils einen Teilaspekt der Krankheitsentstehung modellieren. Das Cuprizone-Modell stellt die toxisch induzierte Demyelinisierung, das EAE-Modell die autoimmunvermittelte Inflammation dar. Für die Untersuchung der Expression der neuronalen Gerüstproteine Ankyrin G und beta-IV Spektrin werden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Expression von Ankyrin G an den Ranvier-Schnürringen wird jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten im Cuprizone-Modell untersucht. Hier beschäftige ich mich mit der Frage, ob in der Frühphase der Cuprizone induzierten Demyelinisierung signifikante Veränderungen der Expression des Gerüstproteins Ankyrin G an den Ranvier-Schnürringen auftreten. Zusätzlich möchte ich untersuchen, ob das Auftreten der verschiedenen histopathologischen Veränderungen im Cuprizone-Modell (Demyelinisierung, Gliose, Astrozytose, Oligodendrozytenverlust) zeitlich von den Veränderungen der Expression von Ankyrin G abzugrenzen ist.

Die Expression von beta-IV Spektrin am AIS wird nach sensorischer Stimulation und Deprivation im Cuprizone- und EAE-Modell untersucht. Hier beschäftige ich mich mit der Frage, ob die neuronale Plastizität des AIS, gemessen an der Expressionsänderung von beta-IV Spektrin, auch nach toxisch-induzierter Demyelinisierung und autoimmuner Inflammation nachgewiesen werden kann.

Insgesamt ist es Ziel meiner Dissertationsarbeit, einen potentiellen Trigger für die Entstehung der axonalen Degeneration nachzuweisen und möglicherweise die Ranvier-Schnürringe oder das AIS als Ausgangspunkt für weitere pathophysiologische Veränderungen im Rahmen der Erkrankung zu identifizieren.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien und Geräte

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Tierhaltung		
Käfigtyp 1284L	Techniplast	ACRE011
Einstreu Abedd Espe Classic	Abedd	H0234-40
Nestlitz aus Baumwolle	Zoonlab	3097055
ssniff® M-Z Extrudat ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse	Ssniff Spezialdiäten	V1126-003
Haltungsfutter Ratte/ Maus-Haltung, 10mm, autoklavierbar	Ssniff Spezialdiäten	V1534-300
Cuprizone (Bis(cyclohexanone)-oxaldihydrazone)	Sigma Aldrich	C9012-25G Lot#BCB26101V 101755746
Wägeschälchen	VWR	611-9178
Feinstaubfiltermaske FFP3 NR D	zetMask®	30973-01
Hooke Kit™ (MOG ₃₅₋₅₅ / CFA Emulsion PTX)	Hooke Laboratories	Cat#EK-2110 Lot#0120 Exp.date: OCT.2, 2016
Hooke Kit™ (Pertussis Toxin 6µg)	Hooke Laboratories	Lot#1003
Inhalationsnarkotikum Isofluran	abbVie Deutschland	B506 6046359
Gelpad	Triple A Trading	SDSTC-56
Ringer-Lösung Bottelpack 500ml	Serag Wiessner	E04066
Ketamin 10% Injektionslösung für Hunde und Katzen	Medistar CompuGroup Medical Deutschland	00515

Xylazin 2% Injektionslösung für Hunde, Katzen, Rinder, Pferde	CEVA Logistics	209A2
Omnifix®-F Solo ohne Kanüle/ Luer-Ansatz/ zentrisch/ 1ml	B. Braun Melsungen	9161406 V
Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle, 0.30x12mm BL/LB, 30G	B. Braun Melsungen	4656300
Federschere (Modell-Student Vannas Spring Scissors)	Fine Science	91501-09
Perfusion		
Omnifix ® Solo/ Luer-Lock-Ansatz/ zentrisch/ 20ml	B. Braun Melsungen	4617207 V
Infuject ® Spritze für Infusionspumpen/ Luer-Lock-Ansatz/ 50ml	Dispomed Witt	22050
NaCl 0,9% Isotone Kochsalzlösung	B. Braun Melsungen	
Original-Perfusor®-Leitung Typ IV Standard, 1,5 x 2,7 mm	B. Braun Melsungen	8722960
Safety-Multifly®-Kanüle für Kurzzeitinfusionen 20G	Sarstedt	851637235
Infusomat ® Space Leitung Type IV Standard/ Luer-Lock-Ansatz	B. Braun Melsungen	8700036S P
Falconröhrchen	Carl Roth	N463.1
Formaldehyd 37%	Carl Roth	CP10.2
Enghalsflasche mit Schraubverschluss, 1000ml/ 2000ml	VWR	215-1557 215-1558
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck	1.063.461.000
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	1.065.801.000
Natronlauge (NaOH 1mol/l)	Carl Roth	K021.1
Becherglas 1000ml	VWR	213-1111
Trichter Æ250 mm	VWR	221-1730

Filterpapier A240mm	Schleicher & Schuell	594 1/2
Bienenwachs	Carl Roth	5830.1
OP-Besteck (Schere, Pinzette stumpf, Pinzette chirurgisch, Stecknadeln)		
Gewebeaufbereitung		
Einbettungskassetten	Bio Optica	07-7300
Paraffin	Merck	K46815058603
Paraplast	Leica Biosystems	39602012
Objektträger Superfrost® Plus	VWR	63-11310
Xylol (Isomerisch, Analar normapur ACS)	VWR	30 28975.325
Ethanol	Merck	100.983
Tissue-Tek* O.C.T. Compound	VWR, Sakura Finetek	25608-930
Isopentan	VWR	78-78-4 24872229
Trockeneispellets CO ₂ eiskalt (-78,6 °C)	TKD	124-38-9
Saccharose	Merck Millipore	107.687
Färbung		
Zitronensäure-Monohydrat	Merck	1.00244.
Tris C ₄ H ₁₁ NO ₃	Appli Chemie	A-1086
Ethylendiamintetra-essigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma Aldrich	03685
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Pulver ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Merck	L-182-50
Normal donkey serum (Normales Esel Serum)	Sigma Aldrich	D9663

Normal goat serum (Normales Ziegen Serum)	VECTOR	S-1000
Cold Water Fish Gelatine (0,1% Kaltwasser Fisch Gelatine)	Sigma Aldrich	G7041
Bovine Serum Albumine (BSA) 1%	Sigma Aldrich	A-2153
0,05% Tween20 Emulgator	Sigma Aldrich	P-1379
Triton X-100	Sigma Aldrich	T-6878
DePex Mounting Medium	SERVA Electrophoresis	18243
VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (Peroxidase, Standard)	VECTOR	PK-6100
BisBenzimid	Sigma Aldrich	14530
FluorPreserve Reagent	Calbiochem	345787-25ML
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ , 30%	Carl Roth	8070.4
Deckgläser (21x26 mm, 21x32 mm)	VWR	632-1569 632-1572

Tabelle 3: Materialliste

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Primärantikörper		
Anti-Ankyrin G, Klon N106/36 (Maus)	NeuroMab	73-146/ 75-146
Anti-beta-IV Spektrin (Hase)	selbsthergestellt in Mannheim	
Sekundärantikörper		
Esel anti-Maus IgG (H+L) 594 Konjugat (1:200)	Alexa Fluor®	A21203
Esel anti-Maus IgG (H+L) 488 Konjugat (1:200)	Alexa Fluor®	A21202
Esel anti-Hase IgG 488 Konjugat	Alexa Fluor®	A21206
Ziege anti-Maus Ig (biotinyliert)	Linaris Vector	BA-9200
Ziege anti-Hase Ig (biotinyliert)	Linaris Vector	BA-1000

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper

Gerät	Hersteller	Bestellnummer
Küchenmaschine WMF Kult X	WMF Group GmbH	61.3022.0500
Analysenwaage	Sartorius	R 200 D
Einbettautomat	Leica Biosystems	ASP200S
Schlittenmikrotom	Leica Biosystems	SM2000R
Wasserbad	Leica Biosystems	HI1210
Inkubator 48°C (trocknen) UT 12 P	Thermo Scientific Heraeus®	50045764
Kryo-Mikrotom	Leica Biosystems	CM1950
Horizontalschüttler	SunLab®	SU1020
Schüttler VXR	IKA Labortechnik	
Vortex groß	IKA Labortechnik	
Vortex klein	IKA Labortechnik	
Inkubator 26°C T6	Thermo Scientific Heraeus®	50042293
pH-Meter SenTix81	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG	103642
Magnetrührer Combimag RET	IKA Labortechnik	
Einkanal-Pipetten	Eppendorf AG	3120000909
Mikrowelle	Exquisit	MW WP700j17B-2
Konfokal Mikroskop	Olympus Life Science	Olympus BX51WI

Tabelle 5: Geräteliste

2. Versuchstiere und Krankheitsinduktion

Es wurden weibliche C57BL/6 Wild Typ Mäuse für die Durchführung der Versuche verwendet. Die Mäuse wurden von Janvier gezüchtet und in einer pathogenfreien Umgebung gehalten. Der Käfigwechsel und die Tierkontrolle wurden gemäß den Vorgaben der engl. „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA) und der geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt. Die Forschung an Tieren und deren Pflege wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

Die **toxische Demyelinisierung** wurde durch die Fütterung der weiblichen C57BL/6 Mäuse (18-20g Körpergewicht) mit Cuprizone (Bis(cyclohexanone)-oxaldihydrazone/ Sigma-Aldrich, Deutschland) induziert. Es wurde jeweils über einen Zeitraum von 1, 3, 5 und 12 Wochen Cuprizone (Bis(cyclohexanone)-oxaldihydrazone) gefüttert. Das Gemisch aus 100g Mehlfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH/ Deutschland) und 0,25% (0,25g) Cuprizone wurde täglich frisch angesetzt. Das Futter wurde auf 2 Petrischalen mit insgesamt 100g Futter pro Käfig (für 5 Tiere) aufgeteilt. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe erhielten handelsübliche Futterpellets. Das Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung.

Die Induktion der **Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis** bei weiblichen C57BL/6 Mäusen (18-20g Körpergewicht) erfolgte nach dem Protokoll von ‚Hooke Laboratories‘. Es standen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Vor der Injektion wurden die Mäuse durch Ohrmarkierungen gekennzeichnet. Allen 20 Versuchstieren wurde am Tag 0 am Nacken und am Rücken kranial der Schwanzwurzel jeweils 0,1ml der MOG₃₅₋₅₅-Emulsion (Gesamtvolumen pro Maus: 0,2ml) subkutan injiziert. Es wurde den Tieren dann 0,15ml PTX intraperitoneal injiziert. Um eine geringere Effizienz der Immunisierung, bedingt durch die erhöhte Nervosität der Versuchstiere zu vermeiden, wurden diese während der Induktion mit Isofluran (AbbVie, USA) narkotisiert und überwacht. Am Tag 1 erfolgte die zweite PTX-Injektion mit 0,15ml intraperitoneal.

Die Tiere wurden während des Versuchs täglich kontrolliert. Gegebenenfalls wurden die Tiere engmaschiger überwacht oder sie mussten dem Projektleiter vorgestellt werden. Der Zustand der Tiere mit EAE wurde, neben der allgemeinen Tierkontrolle, zusätzlich täglich bewertet (Score von 0,0 bis 5,0). Die Einteilung erfolgte nach dem Protokoll von ‚Hooke Laboratories‘ (Hooke Laboratories, 2008). Die Symptome der an EAE erkrankten Versuchstieren waren meist an Tag 10 bis 13 nach der Immunisierung erkennbar. Ca. 90-100% der Versuchstiere erkrankten und erreichten insgesamt einen maximalen Score von 3,0-3,5 (Hooke Laboratories, 2008). Die Symptome äußerten sich in einer leichten Lähmung der Schwanzspitze bis hin zur vollständigen Ausprägung der Lähmung über den gesamten Bereich der hinteren und vorderen Extremität. Diese Form der

Querschnittslähmung wird Tetraplegie genannt. Ab einem Score von 2,5 wurde der Maus täglich 1ml Ringerlösung (Serag Wiessner, Deutschland) dorsal subkutan injiziert. Um eine fortschreitende Dehydrierung und Malnutrition zu vermeiden, wurde täglich ein frisches Gelpad und Futterpellets, in Wasser aufgeweicht, *ad libitum* bereitgestellt. Bei einem Score von 4,0 an 2 aufeinanderfolgenden Tagen musste das Versuchstier euthanasiert werde.

3. Narkose

Für die Durchführung der Kürzung der Tasthaare wurden die Mäuse narkotisiert. Es wurde ein Gemisch aus 10% *Ketamin* (Medistar, Deutschland), 2% *Xylazin* (Ceva, Deutschland) und 0,9% *NaCl* (B. Braun, Deutschland) steril zubereitet und intraperitoneal injiziert. Das Injektionsvolumen wurde auf das Körpergewicht der Maus abgestimmt: 0,4 μ l *Ketamin* pro g KG, 0,25 μ l *Xylazin* pro g KG und 19,35 μ l *NaCl* pro g KG. Im Verlauf des Versuches wurde das Injektionsvolumen zusätzlich auf die Art der Behandlung und dem damit verbundenen gesundheitlichen Allgemeinzustand angepasst. Die *Ketamin-Xylazin-Lösung* zeigte bei den kranken Tieren eine stärkere und längere Wirkung als bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe. Das Injektionsvolumen wurde deswegen bei der *Cuprizone-Gruppe* auf 66-80% und bei der *EAE-Gruppe* auf 50-66% des ursprünglichen Volumens reduziert.

4. Sensorische Stimulation und Deprivation

Die sensorische Stimulation (Reizung der Tasthaare) und Deprivation (Kürzung der Tasthaare) erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll. Es wurden insgesamt 36 Versuchstiere in 6 Gruppen mit je 6 Versuchstieren aufgeteilt. 3 Gruppen wurden sensorisch depriviert, 3 Gruppen sensorisch stimuliert. Die Kürzung der Tasthaare erfolgte parallel zur *Cuprizone* Behandlung bzw. nach *EAE-Induktion* für einen Zeitraum von 16 Tagen. Für die sensorische Deprivation wurden alle Tasthaare der Maus mit der mikrochirurgischen Federschere (*Fine Science, Deutschland*) gekürzt. Für die Darstellung der Tasthaare wurde ein *Binokular* (*Zeiss, Deutschland*) verwendet. Die sensorische Stimulation erfolgte am jeweils gleichen Tag. Dafür wurden alle Tasthaare der Maus durch Berührung stimuliert, d.h. die Tasthaare wurden für ca. 30 Sekunden gestreichelt. Die Tiere wurden während der Narkose in einen abgedunkelten Käfig gesetzt. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe einer Wärmelampe aufrechterhalten. Der Vorgang wurde mit allen Mäusen gleichermaßen durchgeführt. Für die Darstellung der Auswirkungen der sensorischen Stimulation und Deprivation am AIS wurden anti-beta-IV Spektrin Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

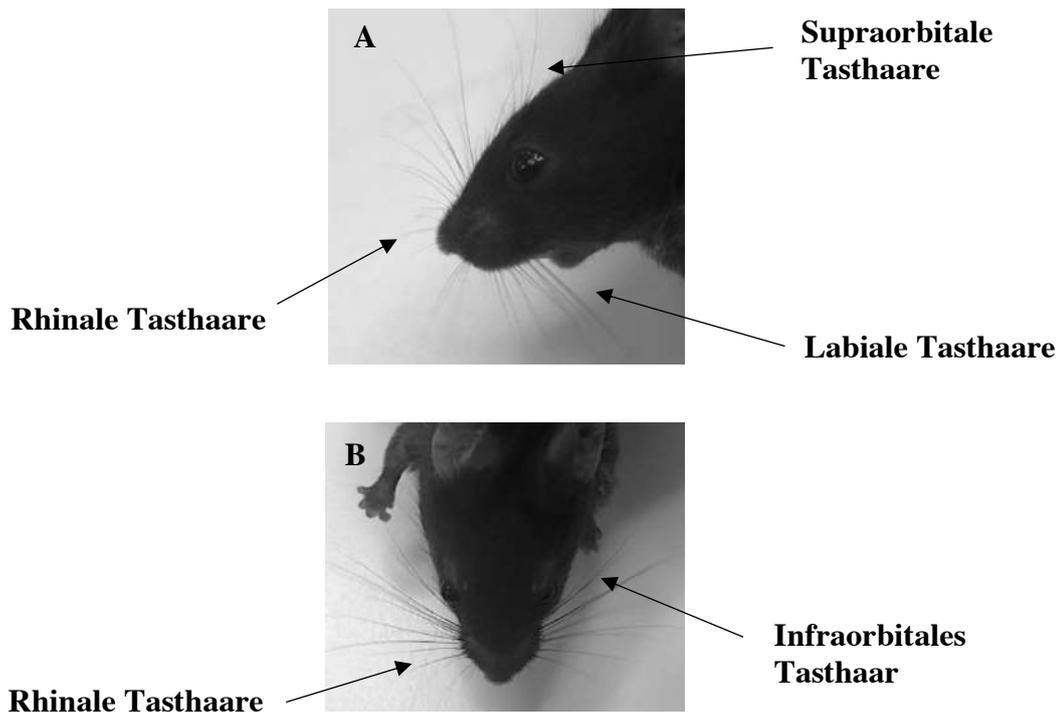


Abbildung 4: *Tasthaare der Maus: (A) zeigt die supraorbitalen Tasthaare und die labialen Tasthaare. (B) zeigt die rhinalen Tasthaare und das infraorbitale Tasthaar.*

5. Gewebeaufarbeitung

Die Gewebeaufarbeitung erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll (siehe **Anhang**). Die Mäuse wurden mit 3,7% Formaldehydlösung (pH = 7.4) transkardial perfundiert. Für die immunhistochemischen Färbungen mit dem Primärantikörper gegen Ankyrin G wurde das Gehirn nach der Postfixation über Nacht vom umliegenden Gewebe gelöst und in Paraffin eingebettet. Die einzelnen Paraffinblöcke wurden entsprechend dem engl. „Mouse Brain Atlas by Sidman et al.“ von Region 215 bis 325 zu 5 μ m dicken Schnitten verarbeitet und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen mit den Primärantikörpern gegen beta-IV Spektrin oder gegen Ankyrin G wurde das Gewebe direkt nach der transkardialen Perfusion in eine Saccharose-Lösung überführt. Es erfolgte keine Postfixation. Die Gehirne wurden in gekühltem Isopentan (-70°C) (VWR International GmbH, Deutschland) eingefroren und bei -20°C gelagert. Es wurden 20 μ m dicke Schnitte aus den Regionen 215 und 265 (entsprechend dem engl. „Mouse Brain Atlas by Sidman et al.“) angefertigt.

6. Immunhistochemie

6.1. Prinzip der Immunhistochemie

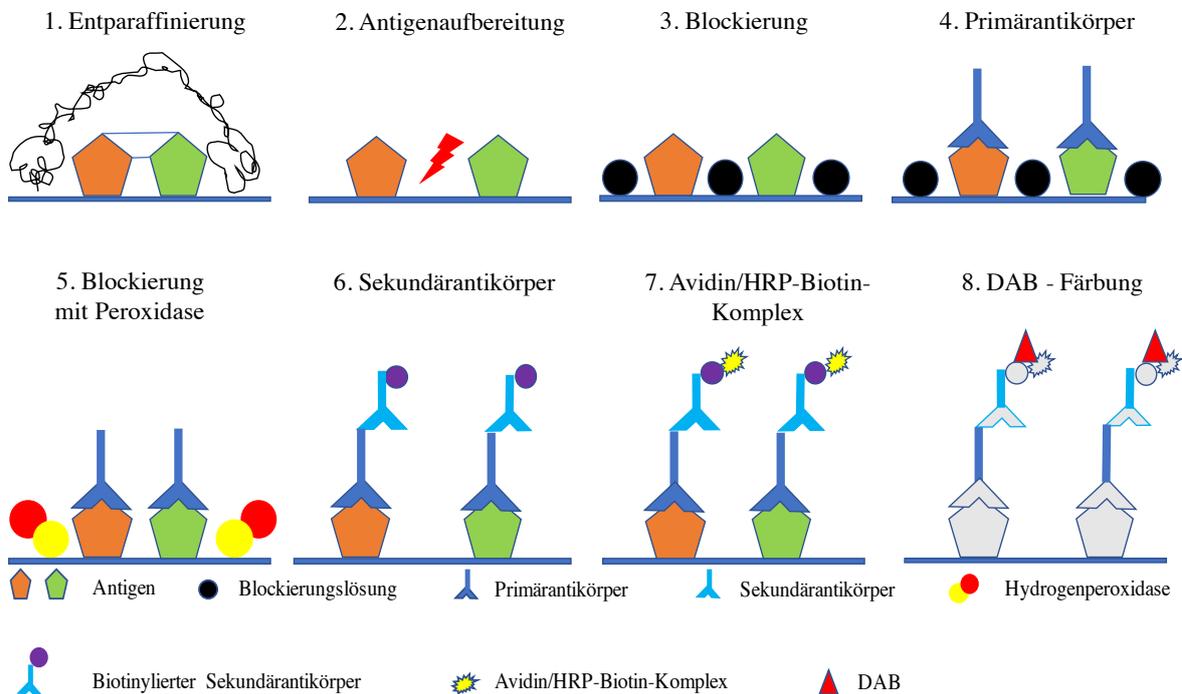


Abbildung 5: Prinzip der Immunhistochemie (ABC-Methode)

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Ausbildung eines spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes. Der Primärantikörper ist gegen das Epitop des gesuchten Antigens gerichtet. Die Visualisierung erfolgt über eine Reihe von Enzym- und Farbreaktionen. Bei der direkten Methode wird das gesuchte Antigen vom Primärantikörper gebunden und über das daran gekoppelte Markermoleküle direkt nachgewiesen. Die Primärantikörper können monoklonaler oder polyklonaler Entität sein. Monoklonale Antikörper binden hoch spezifisch an ein einzelnes Epitop, wohingegen polyklonale Antikörper an mehrere verschiedene Epitope binden können.

Bei der indirekten Methode sind mehrere Zwischenschritte an der Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes beteiligt. Dadurch ist die Erkennung des Antigens sensitiver als bei der direkten Methode.

Für die Darstellung des Gerüstproteins Ankyrin G wurde die immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode verwendet. Bei dieser indirekten Nachweismethode werden die primären, an das gesuchte Antigen gebundenen Antikörper durch biotinylierte Sekundärantikörper detektiert. Der biotinylierte Sekundärantikörper wird bei der ABC-Methode aufgrund der hohen Affinität von Avidin und Biotin spezifisch vom Avidin-

Biotin-Komplex gebunden. Da ein Avidinmolekül vier Biotinmoleküle binden kann, werden neben dem biotinylierten Sekundärantikörper drei der im Avidin-Biotin-Komplex enthaltenen biotinylierten Meerrettichperoxidasen (engl. „horseradish peroxidase“, kurz HRP) vernetzt, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt. Nach Zugabe des DAB-Komplexes (3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Chromogen und 3,3-Diaminobenzidin (DAB)+ Substrat) katalysiert HRP zusammen mit H₂O₂ die Farbreaktion. Im Mikroskop stellen sich die gesuchten Antigene in Form eines braunen Niederschlages dar. Die Zellkerne der Gewebeschnitte wurden durch eine Gegenfärbung mit Hämalaun dargestellt.

6.2. IHC-Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden der **Primärantikörper gegen Ankyrin G** und der **Sekundärantikörper Ziege anti-Maus** verwendet. Die Blockierungslösung wurde speziell für die Färbungen gegen Ankyrin G und beta-IV Spektrin hergestellt. Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde in der absteigenden Alkohol-Reihe entwacht und rehydriert. Die Objektträger (OT) wurden mit Tris/EDTA-Puffer (pH = 9.0) in einer handelsüblichen Mikrowelle erhitzt. Die Epitope wurden dadurch demaskiert (engl. „heat induced epitope retrieval“, kurz HIER-Methode). Das Gewebe wurde 3-mal in Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gespült und anschließend mit dem Primärantikörper gegen Ankyrin G über Nacht inkubiert. Der Primärantikörper wurde in der Blockierungslösung verdünnt. Die Epitop-Primärantikörper Komplexe wurden mit dem VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (Vectorlabs, USA) und dem biotinylierten Sekundärantikörper Ziege anti-Maus (Vector, Deutschland) visualisiert.

Primärantikörper für 750µl: ANTI-ANKYRIN G <i>Antigen: Ankyrin G</i> <i>Wirt: Maus</i> <i>Klon: monoklonal</i> <i>Subtyp: IgG2a</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:750 - 749µl Blockierungslösung - 1µl Primärantikörper
Sekundärantikörper für 1000µl Lösung: „ZIEGE ANTI-MAUS“	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:200 - 995µl Blockierungslösung - 5µl Sekundärantikörper

Tabelle 6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Substanz	Zubereitung
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (10X)- Stocklösung	<ul style="list-style-type: none"> - 47,75g PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (L 182-50 Biochrom) - 5l destilliertes Wasser
PBS (1X)-Fertiglösung	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml PBS (10X Stocklösung) - 4500 ml destilliertes Wasser - pH auf 7.4 einstellen
Tris-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 6,05g Tris (Appli Chemi; A-1086) - 1,85g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Fluka 03685) - 5l destilliertes Wasser - pH auf 9.0 einstellen
Blockierung mit Wasserstoffperoxid: 0,3% H_2O_2 in PBS	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:100 - 1ml H_2O_2 (30% vol/vol) - 99ml PBS
ABC-System (VECTASTAIN Elite Kit-PK 6100) für 1400 μl Lösung	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:50 für A + B - 1344μl PBS - 28μl Flüssigkeit A des Elite ABC-Kit - 28μl Flüssigkeit B des Elite ABC-Kit
3,3-Diaminobenzidin (DAB)- Gebrauchslösung	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:50 - 28μl DAB Stock - 1372μl DAB Substrat

Tabelle 7: *Verwendete Chemikalien*

Substanz	Menge
5% Normales Esel Serum/ optional Normales Ziegen Serum	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:20 - 2,5ml Normales Esel Serum - 47,5ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (1X)
0,2% Kaltwasser Fisch Gelatine	
1% Bovines Serum Albumin	
0,1% Triton X-100	<ul style="list-style-type: none"> - 1ml Triton X-100 - 999ml PBS (1X)

Tabelle 8: Blockierungslösung

TAG 1		
Arbeitsschritt	Ablauf	Dauer
Entparaffinierung	<ul style="list-style-type: none"> - Xylol I - Xylol II - Xylol III - Xylol/ Ethanol 50%/ 50% - Ethanol 100% - Ethanol 100% - Ethanol 96% - Ethanol 96% - Ethanol 70% - Ethanol 50% - Destilliertes Wasser 	<ul style="list-style-type: none"> - 10 min - 10 min - 10 min - 5 min - 3 min
Antigen- Aufbereitung	<ul style="list-style-type: none"> - OTs und Tris-Ethylendiamin-tetraessigsäure in einem Plastikgefäß in der Mikrowelle erhitzen - Im Wasserbad auf Raumtemperatur kühlen 	<ul style="list-style-type: none"> - 10 min - mind. 15 min
Waschschritt	<ul style="list-style-type: none"> - 3-maliges Spülen in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (1X) (auf dem Schüttler) 	<ul style="list-style-type: none"> - je 5 min

Blockierung	<ul style="list-style-type: none"> - Inkubation der Objektträger (OTs) in der Feuchtkammer im Wärmeschrank (standardisierte Raumtemperatur: 24,0°C) mit Blockierungslösung ➔ 100µl je Schnitt 	- 60 min
Primärantikörper	<ul style="list-style-type: none"> - Applikation von ANTI-ANKYRIN G gelöst in Blockierungslösung und Inkubation in der Feuchtkammer im Kühlschrank (4°C) ➔ Verdünnung 1:750 ➔ 100µl je Schnitt 	- Über Nacht
TAG 2		
Waschschritt	- Siehe TAG 1	- 15 min
Blockierung mit Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	<ul style="list-style-type: none"> - Applikation von 0,3% H₂O₂ (in PBS und lichtgeschützt) ➔ Verdünnung 1:100 	- 30 min
Waschschritt	- Siehe TAG 1	- 15 min
Sekundärantikörper	<ul style="list-style-type: none"> - Applikation von ZIEGE ANTI-MAUS gelöst in Blockierungslösung und Inkubation in der Feuchtkammer im Wärmeschrank ➔ Verdünnung 1:200 ➔ 100 µl je Schnitt 	- 60 min
Waschschritt	- Siehe TAG 1	- 15 min
Avidin/HRP-Biotin Komplex	<ul style="list-style-type: none"> - Applikation von Avidin/ HRP-Biotin Komplex gelöst in PBS(1X) und Inkubation in der Feuchtkammer im Wärmeschrank ➔ Verdünnung 1:50 für A+B 	- 60 min

Waschschritt	- Siehe TAG 1	- 15 min
DAB-Färbung	- Inkubation in der Feuchtkammer mit DAB-Gebrauchslösung - Verdünnung 1:50 - OTs einzeln in Leitungswasser und dann in destilliertem Wasser spülen	- 10 min
Hämalaun-Färbung (fakultativ)	- OTs in Hämalaun schwenken - In Leitungswasser spülen - In destilliertem Wasser spülen	- 30 sec - 5 min - 5 min
Dehydrierung	- Ethanol 50% - Ethanol 70% - Ethanol 96% - Ethanol 96% - Ethanol 100% - Ethanol 100% - Xylol / Ethanol 50%/ 50% - Xylol I - Xylol II - Xylol III	- 3 min - 3 min - 3 min - 3 min - 3 min - 3 min - 5 min - 10 min - 10 min - 10 min
Eindecken	- Mit DePex-Eindeckmedium und Deckgläschen passender Größe eindecken - OTs werden mit Gewichten beschwert und getrocknet	- Über Nacht

Tabelle 9: Protokoll der immunhistochemischen Färbung

7. Immunfluoreszenzfärbung

7.1. Prinzip der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz (IF) zählt wie die Immunhistochemie zu den Verfahren der diagnostischen Analysemethoden. Es wird ebenfalls die direkte von der indirekten Methode unterschieden. Bei der direkten IF kann das gesuchte Protein durch die Markierung mit einem spezifischen fluoreszierenden Antikörper nachgewiesen werden. Die indirekte IF-Färbung verläuft in mindestens zwei Schritten. Die Färbung erfolgt nicht direkt über den Primärantikörper, sondern über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper.

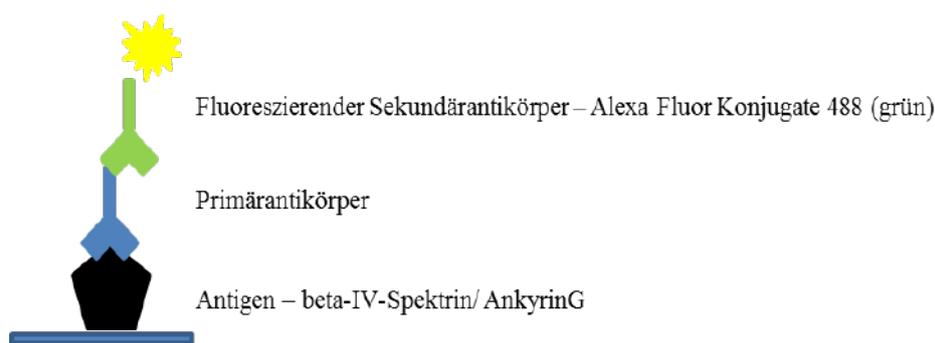


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung

7.2. IF-Färbung

Für die IF-Färbung wurde das geschnittene kryokonservierte Gewebe mehrmals in PBS gewaschen. Nach der einstündigen Inkubation in der Blockierungslösung, wurde das Gewebe mit dem Primärantikörper gegen beta-IV Spektrin oder gegen Ankyrin G über Nacht inkubiert. Der Primärantikörper wurde in der Blockierungslösung verdünnt. Nachdem das Gewebe 3-mal in PBS gespült wurde, erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper anti-Hase (Alexa Fluor 488 Esel IgG (H+L); Invitrogen, Deutschland) oder anti-Maus (Alexa Fluor 488 Esel IgG (H+L); Invitrogen, Deutschland). Beide Sekundärantikörper wurden in der Blockierungslösung verdünnt. Für die Darstellung der Zellkerne wurde das Gewebe für 10 Minuten in einer Gebrauchslösung aus 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und destilliertem Wasser inkubiert.

Primärantikörper für 500 μ l 1. ANTI-BETA-IV SPEKTRIN <i>Antigen: beta-IV Spektrin</i> <i>Wirt: Hase</i> 2. ANTI-ANKYRIN G <i>Antigen: Ankyrin G</i> <i>Wirt: Maus</i> <i>Klon: monoklonal</i> <i>Subtyp: IgG2a</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:500 - 499μl Blockierungslösung - 1μl Primärantikörper
Sekundärantikörper für 1000 μ l Lösung: 1. „ESEL ANTI-HASE IgG (H+L) 488 KONJUGAT “ 2. „ESEL ANTI-MAUS IgG (H+L) 488 KONJUGAT”	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:200 - 995μl Blockierungslösung - 5μl Sekundärantikörper

Tabelle 10: *Verwendete Primär- und Sekundärantikörper*

Substanz	Zubereitung
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (10X)-Stocklösung	- Siehe Tabelle 7
PBS (1X)-Fertiglösung	- Siehe Tabelle 7
Blockierungslösung	- Siehe Tabelle 8
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Stock A (lichtgeschützt)	<ul style="list-style-type: none"> - 10mg BisBenzimid-DAPI (Sigma 14530) - 1ml destilliertes Wasser
DAPI Stock B (lichtgeschützt)	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:1000 - 1μl DAPI Stock A - 1ml destilliertes Wasser
DAPI-Gebrauchslösung	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:10 - 100μl DAPI Stock B - 900μl destilliertes Wasser

Tabelle 11: *Verwendete Chemikalien*

TAG 1		
Arbeitsschritt	Ablauf	Dauer
Waschschritt	- Siehe Tabelle 9	- 15 min
Blockierung	- Inkubation der Objektträger (OTs) in der Feuchtkammer im Wärmeschrank mit Blockierungslösung → 100µl je Schnitt	- 60 min
Primärantikörper	- Applikation von ANTI-BETA-IV SPEKTRIN/ ANTI-ANKYRIN G gelöst in Blockierungslösung und Inkubation in der Feuchtkammer im Kühlschrank (4°C) → Verdünnung 1:500 → 100µl je Schnitt	- über Nacht
TAG 2		
Waschschritt	- Siehe Tabelle 9	- 15 min
Sekundär-antikörper	- Applikation von ESEL ANTI-HASE-IgG (H+L) 488 KONJUGAT/ ESEL ANTI-MAUS-IgG (H+L) 488 KONJUGAT gelöst in Blockierungslösung (lichtgeschützt) und Inkubation der OTs in der Feuchtkammer im Wärmeschrank → Verdünnung 1:200 → 100µl je Schnitt	- 90 min
Waschschritt	- Siehe Tabelle 9	- ca. 15 min
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung	- Inkubation in der Feuchtkammer im Wärmeschrank mit DAPI-Gebrauchslösung → Verdünnung 1:10 des DAPI Stock B	- 10 min

Spülen	- 2-maliges Spülen in destilliertem Wasser (lichtgeschützt und auf dem Schüttler)	- Je 5 min
Eindecken	- Mit FluorPreserve Reagenz und Eindeckgläschen passender Größe eindecken	
Lagerung	- Versiegelung des Deckglases auf dem OT mit herkömmlichem Nagellack - Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C	

Tabelle 12: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

8. Auswertung

8.1. Auswertung der IHC-Färbung

Für die Aufnahmen der chromogenen Färbungen wurde ein Mikroskop (Eclipse E200, Nikon, Deutschland) mit einem installierten Kamerasystem (Digital sight DS-2Mv und DS-L2 Mikroskop Kontroll-Einheit, Nikon, Deutschland) verwendet. Die Auswertung der Bilder erfolgte über die frei verfügbare ImageJ-Software (ImageJ Software 2.0.0. für Windows; Wayne Rasband, NIH, USA).

Für das densitometrische Ausmessverfahren über ImageJ wurde die ROI (engl. „region of interest“) bei jeder einzelnen Aufnahme der immunhistochemischen Färbungen bestimmt und ein einheitlicher Schwellenwert, der sog. „Threshold“ festgelegt. Als optimales Format wurde „Percentile“ ausgewählt. Die Originalaufnahmen wurden in Schwarz-Weiß- bzw. Binärbilder (8-bit) umgewandelt. Bei diesen Binärbildern wurde der Anteil der Ankyrin G-positiven Bereiche an der ROI bestimmt. Das Ergebnis der densitometrischen Analyse wurde in Prozent an Fläche (%Area) angegeben.

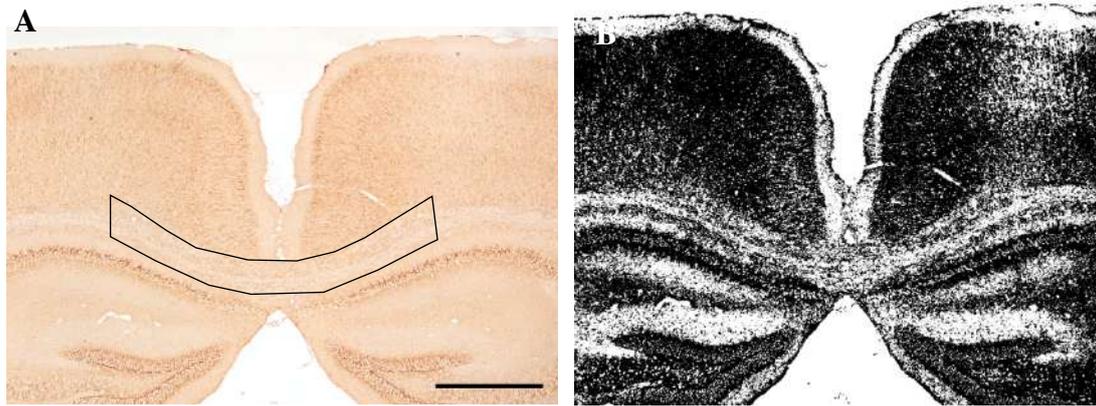


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von Ankyrin G im medialen Corpus Callosum (CC)

(A) Darstellung der engl. „region of interest“: mediales CC der Region 265. (B) Binärbild zu der Abbildung 14 A. Maßstab: 500µm (A, B).

8.2. Auswertung der IF-Färbung

Es wurden Übersichtsaufnahmen des primär somatosensorischen Kortex (pScx) der Region 265 erstellt. Die Ausschnitte der Kortex Schicht II/ III (siehe Abbildung 8A) zeigten den pScx (Vergrößerung: Objektiv 60x/ Ölimmersion). Hier liegt der Fasskortex des somatosensorischen Kortex.

Der 20µm dicke Schnitt wurde entlang der Z-Achse gescannt. Dabei wurden Aufnahmen im Z-Achsenstritt von 0,5µm erstellt (siehe Abbildung 8B). Diese wurden als „Maximale Projektion“ auf einer Ebene dargestellt (siehe Abbildung 8C). Das AIS wurde in der gesamten Länge abgebildet und korrekt ausgemessen. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokal Mikroskop (Olympus Life Science/ Fixed Stage Upright Microscope/ Olympus BX51WI) erstellt.

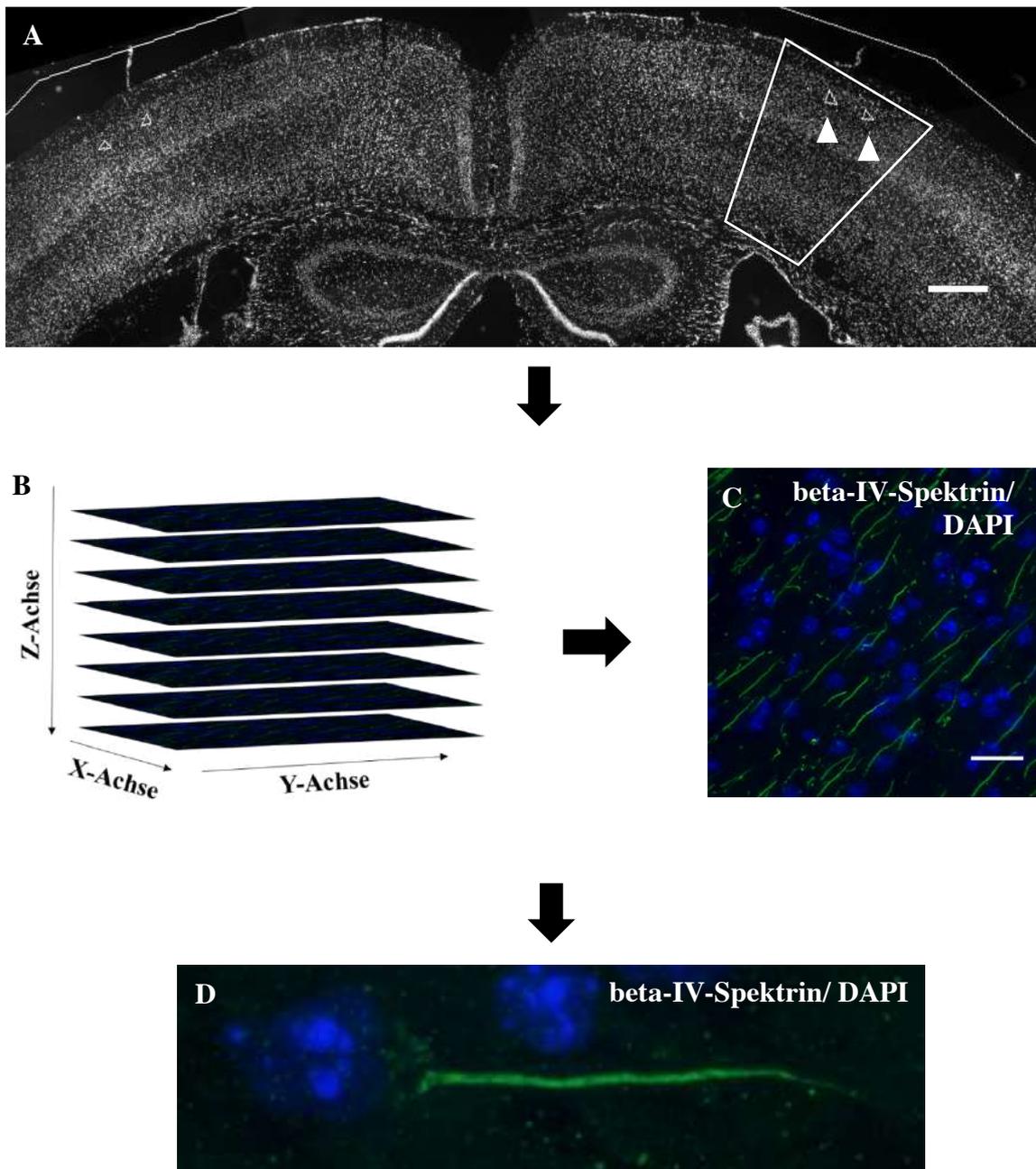


Abbildung 8: Darstellung der in der Studie analysierten Gehirnregionen im Cuprizone- und Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis-Modell

(A) Übersichtsaufnahme des primär somatosensorischen Kortex (pScx) (Box) der Region 265 (gemäß dem engl. „Mouse Brain Atlas“ nach Sidman et al.). Die Pfeilspitzen markieren die Kortex Schicht II/ III. (B) Z-Stack der dreieckig umrandeten Flächen. (C) Immunhistochemischer Nachweis von beta-IV Spektrin. (D) zeigt einen Ausschnitt derselben Färbung: Axon Initial Segment mit dazugehörigem Zellkern. Maßstab: 100µm (A) und 20µm (C).

Die Länge des einzelnen AIS wurde mit einem selbst entworfenen Makro (Institut für Neuroanatomie, Fakultät für Medizin Mannheim, Universität Heidelberg) für Fiji (ImageJ) und engl. „Visual Basic for Applications“ (VBA, Excel, Microsoft) ausgemessen. Die Quantifizierung des AIS aus der Intensität der Färbung wurde im Rahmen einer verblindeten Studie durchgeführt.

Die Ausmessung des AIS erfolgte in mehreren Schritten:

1. Das AIS wurde als Rechenoperation des Makros als gerade Linie dargestellt. Die Kurven und Windungen im Verlauf des AIS wurden geglättet. Anschließend erfolgte die Betrachtung jedes einzelnen Pixels entlang des AIS.



Abbildung 9: Schematische Darstellung der Ausmessung des Axon Initial Segments

2. In einem Histogramm wurde die Intensität der Färbung (in %) gegen jedes einzelne Pixel aufgetragen.

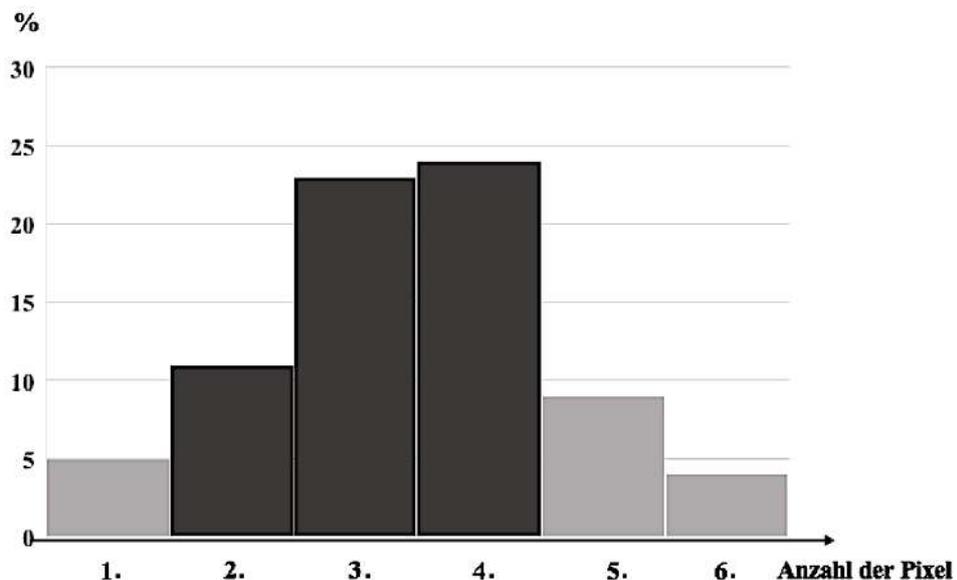


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Histogramms

3. Wenn die Färbeintensität des Pixels über dem Schwellenwert von 10% lag, wurde dieser in die Längenmessung miteingeschlossen. Der Schwellwert wurde an der maximalen Intensität der Färbung des jeweiligen Bildes gemessen.
4. Die Anzahl der gefärbten Pixel wurde in Excel in μm übertragen. Bei einem Objektiv der Vergrößerung 60x entspricht das $0,134\mu\text{m}$ pro Pixel (Gutzmann et al., 2014)

8.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Software (GraphPad Software inc., Version 5.04 für Windows; San Diego California, USA). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mittels One-way ANNOVA, gefolgt von einem Dunn´s Post-Hoc-Test geprüft. Das Ergebnis wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn der p-Wert unter 0,05 lag. Dementsprechend gilt * als $p < 0,05$; ** als $p < 0,01$ und *** als $p < 0,001$. Alle Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (SEM=Standard Error of the Mean) angegeben.

IV. ERGEBNISSE

1. Ankyrin G-Expression im Cuprizone-Modell

1.1. Verminderte Ankyrin G-Expression im medialen Corpus Callosum bei fortlaufend Cuprizone-induzierter Demyelinisierung

Die Demyelinisierung des ZNS ist ein zentrales Element bei der Entstehung neurologischer Erkrankungen wie der MS. Im Rahmen meiner Dissertationsarbeit wurde das mediale CC auf Cuprizone-induzierte, metabolische Schäden und Veränderungen an den Ranvier-Schnürringen untersucht. Um das Auftreten der verschiedenen histopathologischen Veränderungen zeitlich voneinander abzugrenzen, wurden diese nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone Behandlung untersucht.

In einem ersten Schritt wurden der Myelinisierungsgrad, die Mikrogliazellen, die Astrozyten und die Oligodendrozyten in Gehirnen von Versuchstieren aus der Kontrollgruppe untersucht. Dazu wurden anti-PLP, anti-IBA1, anti-GFAP und anti-OLIG2 immunhistochemische Färbungen durchgeführt und im Rahmen einer qualitativen Studie ausgewertet (Gruppengröße: n=1 bzw. n=4).

Für die Darstellung des Myelinisierungsgrades des medialen CC wurden die anti-PLP immunhistochemische Färbungen durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Abbildung 11 zeigt eine hohe PLP-Expression in der Kontrollgruppe. Das mediale CC ist vollständig myelinisiert.

In einem nächsten Schritt untersuchte ich die Mikrogliazellen im medialen CC von Versuchstieren aus der Kontrollgruppe. Hierfür wurden anti-IBA1 gefärbte Schnitte verwendet. Wie für die Kontrollgruppe zu erwarten, zeigten sich nur vereinzelt IBA1-positive Zellen und eine Mikrogliaaktivierung ist kaum zu erkennen.

Für die Darstellung der Astrozyten im medialen CC wurde der Primärantikörper gegen GFAP verwendet. Dabei konnte ich eine geringe anti-GFAP Immunreaktivität erkennen. Zudem untersuchte ich unreife und reife Oligodendrozyten. Dafür wurden anti-OLIG2 gefärbte Schnitte verwendet. Abbildung 14 zeigt eine hohe anti-OLIG2 Immunreaktivität im medialen CC von einem Versuchstier aus der Kontrollgruppe.

Zusätzlich zur Darstellung der PLP, IBA1, GFAP und OLIG2 Expression unter Kontrollbedingungen, habe ich die Demyelinisierung, die Mikrogliaaktivierung, die Astrozytose und den Oligodendrozytenverlust im medialen CC nach verschiedenen Phasen der Cuprizone-Intoxikation untersucht. Dafür wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt und im Rahmen einer qualitativen Studie ausgewertet.

In einem ersten Schritt untersuchte ich die Demyelinisierung des medialen CC nach 1, 3 und 5 Wochen. Hierfür wurden anti-PLP immunhistochemische Färbungen durchgeführt

und densitometrisch ausgewertet. Nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation konnte ich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Abnahme der anti-PLP Färbeintensität feststellen. Nach 3 Wochen war die anti-PLP Färbeintensität deutlich verringert, ebenso nach 5 Wochen (siehe Abbildung 11).

Die Mikrogliaaktivierung wurde mit Hilfe von anti-IBA1 gefärbten Schnitten dargestellt. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Zunahme der anti-IBA1 Färbeintensität nach 3 und 5 Wochen, sowie eine deutliche Hyperplasie und Hypertrophie der Mikrogliazellen.

In einem nächsten Schritt untersuchte ich die Astrozytose im medialen CC bei fortlaufender Cuprizone-Intoxikation. Für die Darstellung der Astrozyten wurde der Primärantikörper gegen GFAP verwendet. Abbildung 13 zeigt die signifikante Zunahme der anti-GFAP Färbeintensität nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Morphologie der Astrozyten änderte sich ebenfalls. Unter Kontrollbedingungen konnte ich vorwiegend schlanke Zellkörper mit kurzen Ausläufern beobachten. Nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation waren die Astrozyten Zellkörper stark hypertroph und multipolar (mit vielen Ausläufern).

Des Weiteren untersuchte ich unreife und reife Oligodendrozyten in anti-OLIG2 gefärbten Schnitten nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. Nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation war im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Abnahme der OLIG2-Expression erkennbar (siehe Abbildung 14), ebenso nach 3 und 5 Wochen.

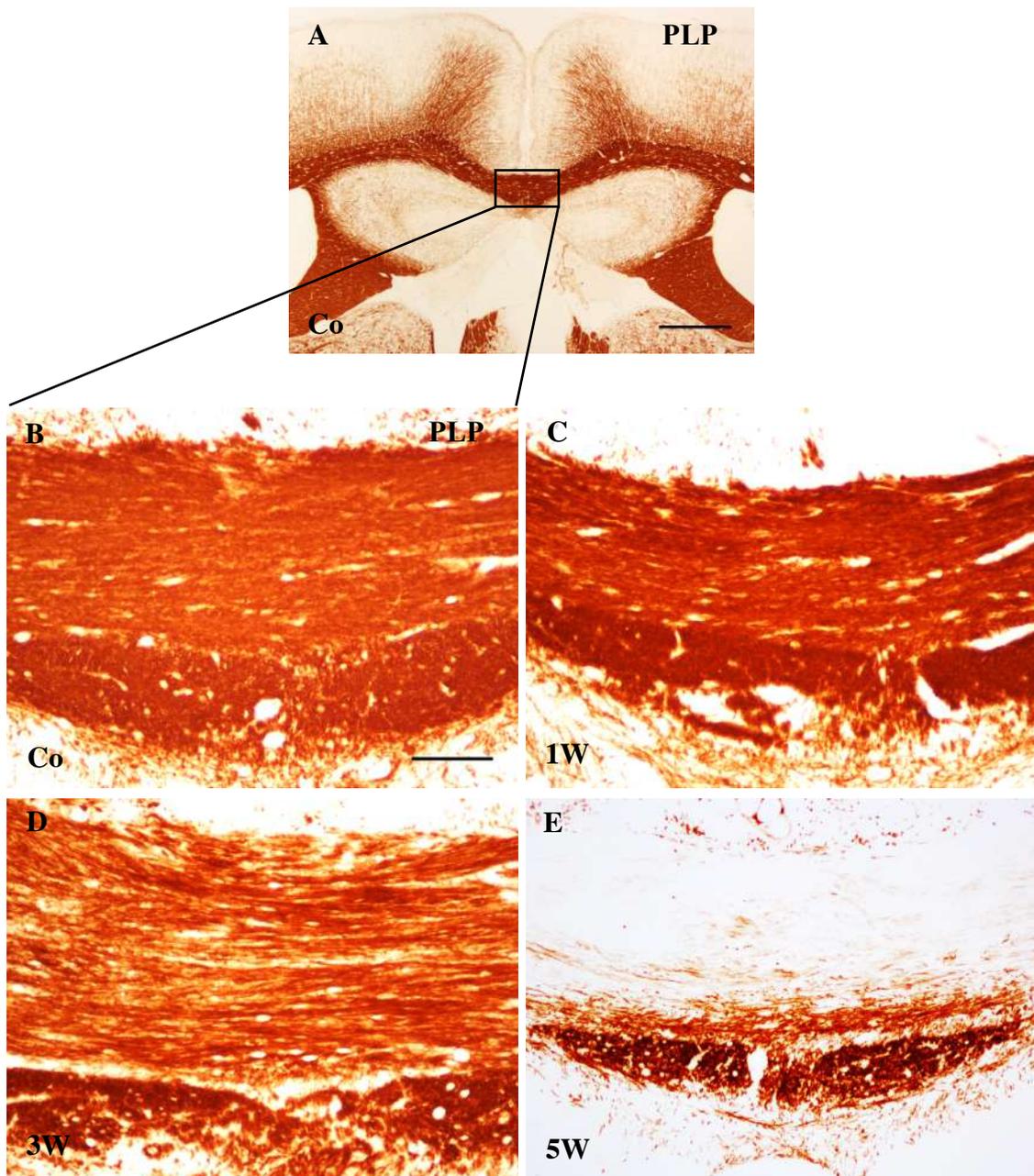


Abbildung 11: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von Proteolipid-Protein (PLP) im medialen Corpus Callosum nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine anti-PLP immunhistochemische Färbung in der Übersicht (Region 265; (Sidman, 2017)). (A) und (B) zeigen eine anti-PLP immunhistochemische Färbung eines Kontrolltiers. (C), (D) und (E) zeigen die Färbung nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. Die Expression von PLP im medialen Corpus Callosum nimmt nach der Cuprizone-Intoxikation deutlich ab. Das mediale Corpus Callosum ist deutlich demyelinisiert.

Maßstab: 500µm (A) und 50µm (B-E). Co=Kontrollgruppe; W=Wochen.

Gruppengröße: n=4; Gesamt: 16 Versuchstiere.

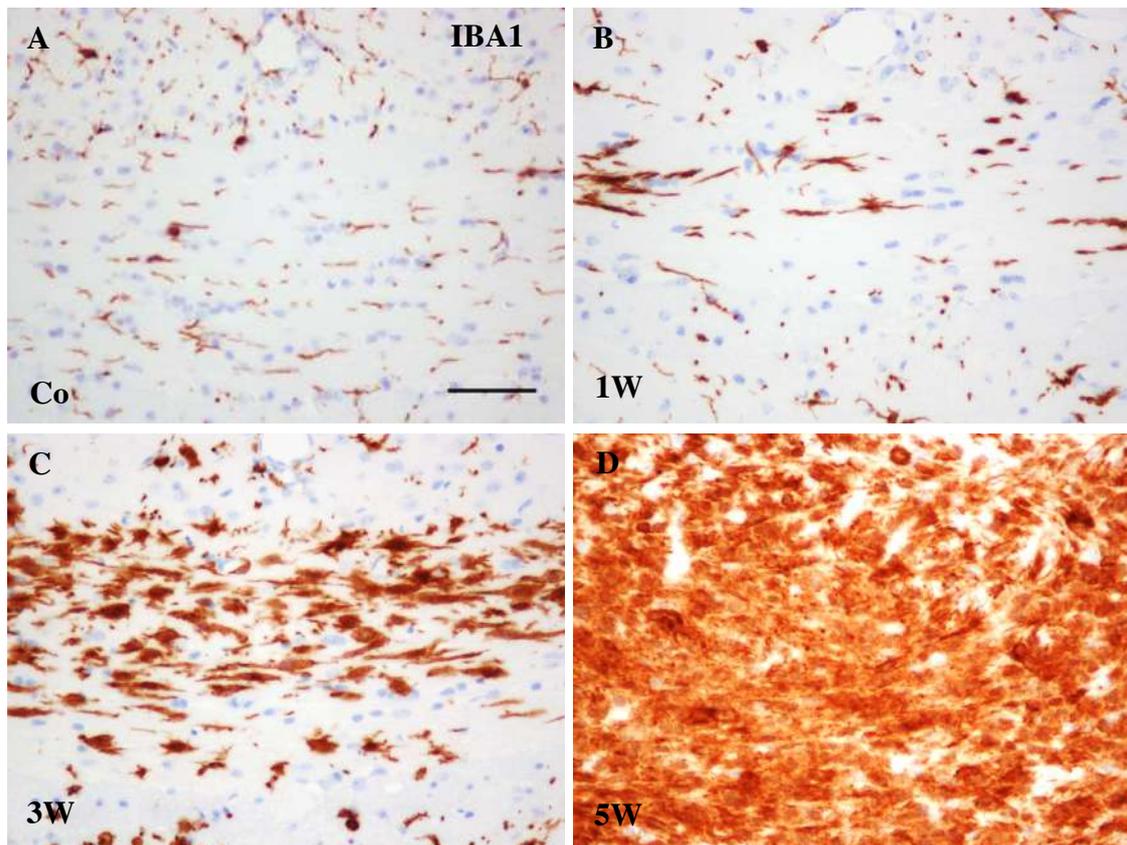


Abbildung 12: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von engl. „Ionized calcium binding adaptor molecule 1“ (IBA1) im medialen Corpus Callosum nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation

Die Aufnahmen wurden in der Frontalebene erstellt (Region 265; (Sidman, 2017)). (A) zeigt eine anti-IBA1 immunhistochemische Färbung eines Kontrolltiers. (B), (C) und (D) zeigen die Färbung nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. Die Expression von IBA1 im medialen Corpus Callosum nimmt nach Cuprizone-Intoxikation deutlich zu. Hier zeigt sich eine ausgeprägte Mikrogliaaktivierung.

Maßstab: 50µm (A-D). Co=Kontrollgruppe; W=Wochen

Gruppengröße: n=4; Gesamt: 16 Versuchstiere.

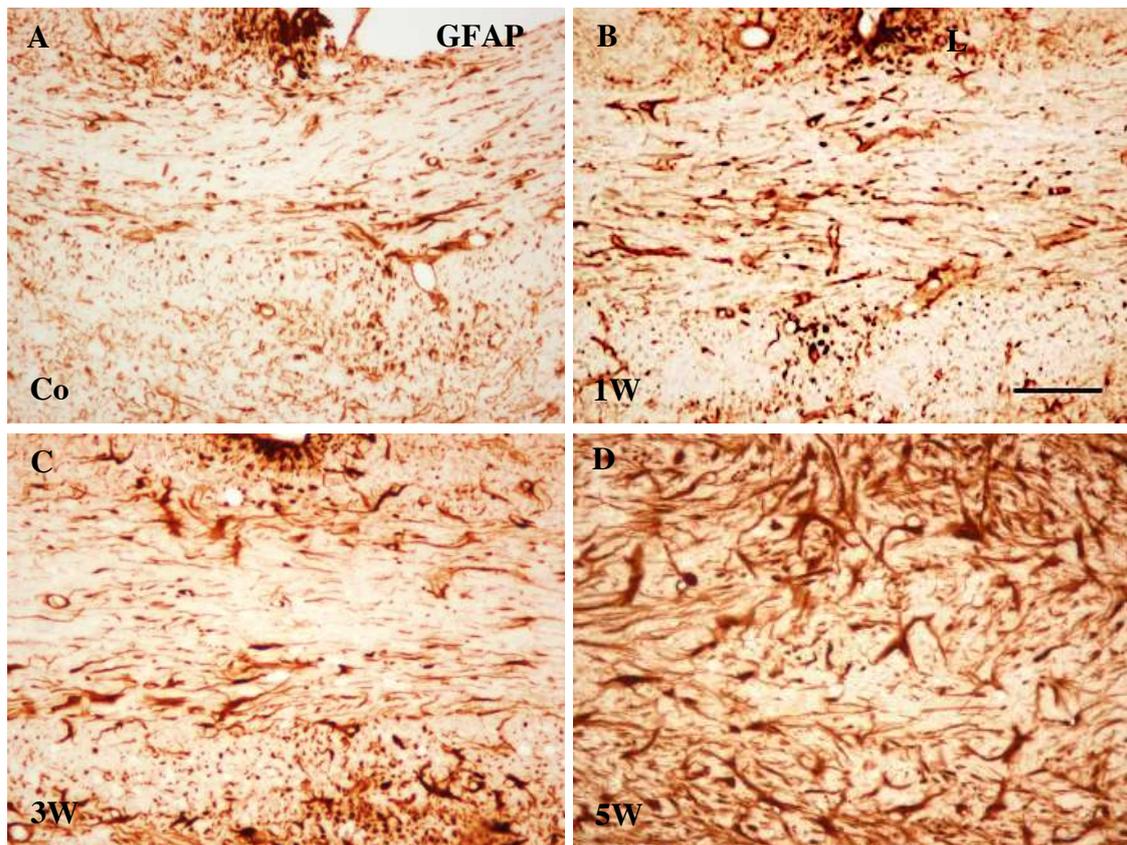


Abbildung 13: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von engl. “Glial fibrillary acidic protein” (GFAP) im medialen Corpus Callosum nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation

Die Aufnahmen wurden in der Frontalebene (Region 265; (Sidman, 2017)) erstellt. (A) zeigt eine anti-GFAP immunhistochemische Färbung eines Kontrolltiers. (B), (C) und (D) zeigen die Färbung nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. Die Expression von GFAP im medialen Corpus Callosum nimmt nach Cuprizone-Intoxikation deutlich zu. Hier zeigt sich eine ausgeprägte Astrozytose.

Maßstab: 50µm (A-D). Co=Kontrollgruppe; W=Wochen.

Gruppengröße: n=4; Gesamt: 16 Versuchstiere.

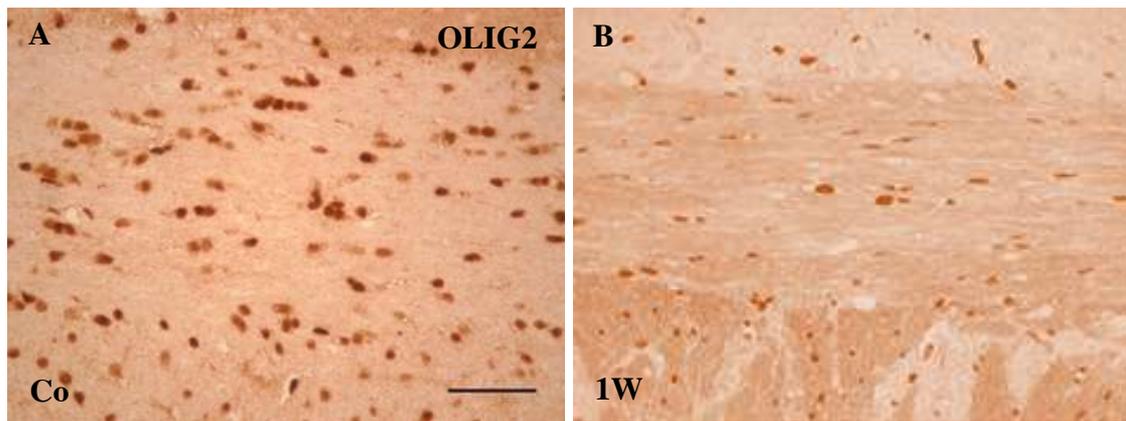


Abbildung 14: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von engl. „Oligodendrocyte transcription factor 2“ (OLIG2) im medialen Corpus Callosum nach 1 Woche

Die Aufnahmen wurden in der Frontalebene (Region 265; (Sidman, 2017)) erstellt. (A) zeigt eine anti-OLIG2 immunhistochemische Färbung eines Kontrolltiers. (B) zeigt die Färbung nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation. Die Expression von OLIG2 im medialen Corpus Callosum nimmt nach Cuprizone-Intoxikation deutlich ab.

Maßstab: 50µm (A – C). Co=Kontrollgruppe; W=Wochen.

Gruppengröße: n=1; Gesamt: 2 Versuchstiere.

Neben den qualitativen Studien zum Nachweis der Demyelinisierung, Mikrogliaaktivierung, Astrozytose und dem Verlust von Oligodendrozyten, untersuchte ich die Expression von Ankyrin G im medialen CC in Gehirnen von insgesamt 18 Versuchstieren (Gruppengröße: n=4 bzw. n=5). Es wurden anti-Ankyrin G immunhistochemische Färbungen durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Dabei konnte ich in Gehirnen von Versuchstieren aus der Kontrollgruppe zunächst eine hohe anti-Ankyrin G Färbeintensität ($54,54 \pm 4,34$ (Mittelwert \pm SEM)) nachweisen.

In einem nächsten Schritt untersuchte ich die Ankyrin G-Expression im medialen CC nach verschiedenen Phasen der Cuprizone-Intoxikation. Dafür wurden Versuchstiere nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation untersucht. Nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation konnte ich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der Ankyrin G-Expression erkennen. Diese Veränderung der Ankyrin G-Immunreaktivität war ebenfalls nach 3 und 5 Wochen deutlich sichtbar. Insgesamt konnte ich eine signifikante Abnahme der Ankyrin G-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen Phasen der Cuprizone-Intoxikation nachweisen.

Die anti-Ankyrin G Färbeintensität wurde mit Hilfe einer densitometrischen Messung analysiert und quantifiziert. Es wurde der prozentuale Anteil der Ankyrin G-positiven

Bereiche in der ROI im medialen CC nach den verschiedenen Phasen der Cuprizone-Intoxikation errechnet und gegenüber der Kontrollgruppe verglichen.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, war nach 1 Woche Cuprizone-Intoxikation eine signifikante Abnahme der anti-Ankyrin G Färbeintensität nachweisbar ($37,45 \pm 2,38$ (Mittelwert \pm SEM); $p < 0,01$). Eine deutliche Abnahme der Ankyrin G-Expression war ebenfalls nach 3 ($6,24 \pm 2,18$ (Mittelwert \pm SEM); $p < 0,001$) und 5 Wochen ($3,57 \pm 0,75$ (Mittelwert \pm SEM); $p < 0,001$) Cuprizone-Intoxikation im Bereich des medialen CC zu sehen.

Insgesamt konnte ich früh nach Beginn der Cuprizone-Intoxikation (1 Woche) eine signifikante Abnahme der Ankyrin G-Expression nachweisen. Im Vergleich zu anderen Cuprizone-induzierten histopathologischen Veränderungen im medialen CC (Demyelinisierung, Gliose, Astrozytose, Oligodendrozytenverlust) lag die Abnahme der anti-Ankyrin G Färbeintensität zeitlich vor dem Eintritt der meisten anderen Schäden durch Cuprizone. Diese waren erst nach 3- bis 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation deutlich erkennbar.

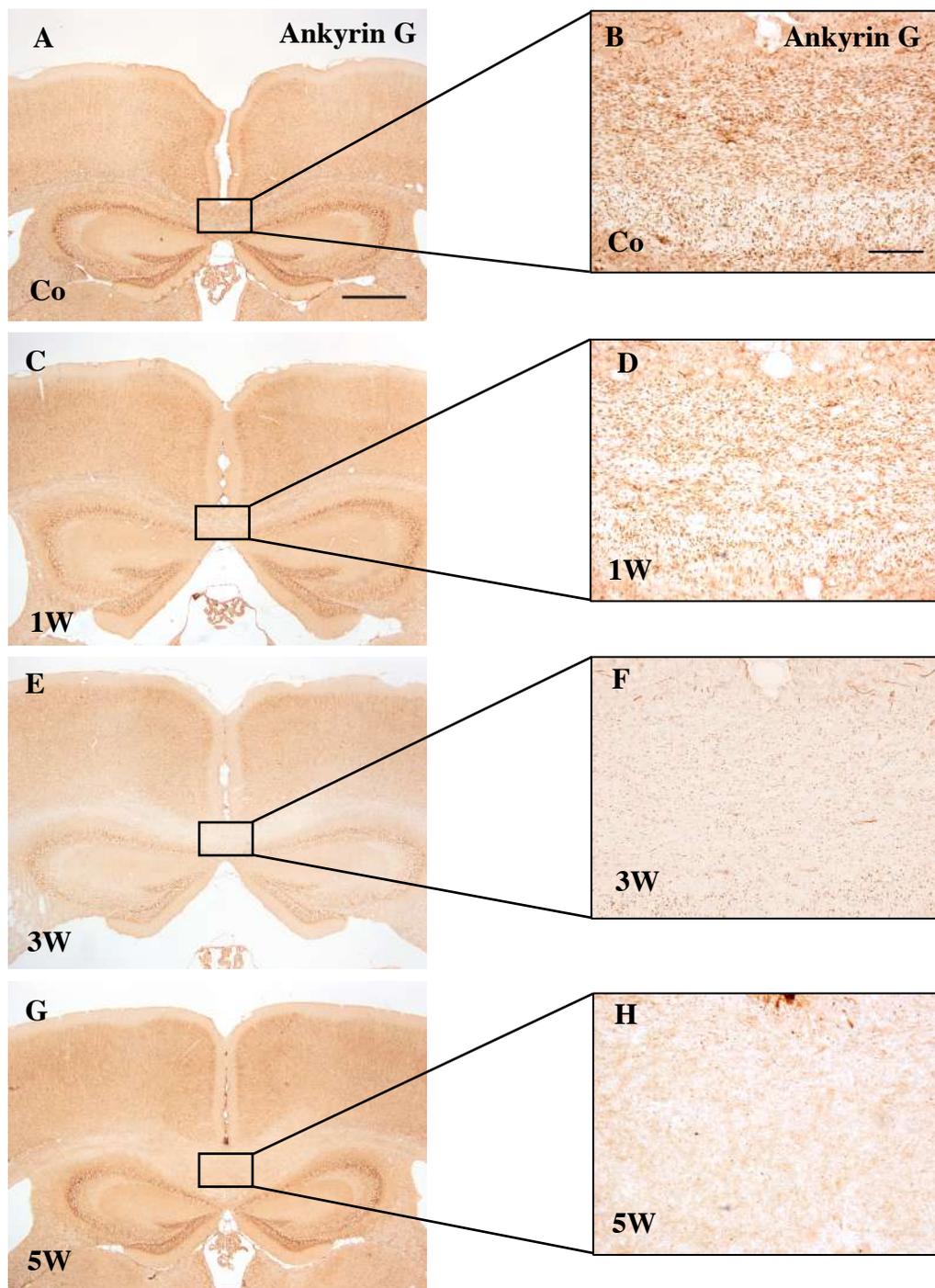


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von Ankyrin G im medialen Corpus Callosum nach verschiedenen Phasen der Cuprizone-Intoxikation

Die Abbildungen (A, C, E, G) sind Übersichtsaufnahmen des medialen Corpus Callosum. (A) und (B) zeigen eine anti-Ankyrin G immunhistochemische Färbung des medialen Corpus Callosum bei einem Kontrolltier. (C) – (H) zeigen die Färbung nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation. Die Expression von Ankyrin G im medialen Corpus Callosum nimmt nach der Cuprizone-Intoxikation deutlich ab.

Maßstab: 500µm (A, C, E, G) und 50µm (B, D, F, H). Co=Kontrollgruppe; W=Wochen
Gruppengröße: n=4 bzw. n=5; Gesamt: 18 Versuchstiere.

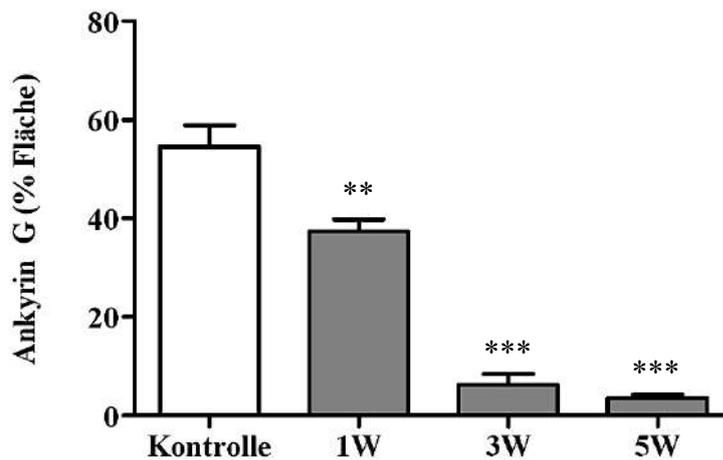


Abbildung 16: Grafische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung der Ankyrin G-Expression (in %)

Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der Ankyrin G-positiven Bereiche im medialen Corpus Callosum bei mehrwöchiger Cuprizone-Intoxikation der Versuchstiere aus unterschiedlichen Behandlungsgruppen. P-Wert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. W=Wochen. Gruppengröße: $n=4$ bzw. $n=5$ Versuchstiere; Gesamt: 18 Versuchstiere.

1.2. Ankyrin G-Expression im medialen Corpus Callosum nach Remyelinisierung

Im Rahmen einer qualitativen Studie wurde der Myelinisierungsgrad, die Mikrogliaaktivierung und die Astrozytose nach der Remyelinisierungsphase untersucht. Dazu wurde das Cuprizone-Modell verwendet. Die Versuchstiere wurden für einen Zeitraum von 5 Wochen mit Cuprizone behandelt, anschließend wurde der Kupfer-Chelator abgesetzt und die Tiere wurden für weitere 2 Wochen mit normalem Futter gehalten. Es wurden anti-PLP, anti-IBA1 und anti-GFAP immunhistochemische Färbungen durchgeführt und ausgewertet (Gruppengröße $n=4$). In einem ersten Schritt untersuchte ich den Myelinisierungsgrad des medialen CC anhand anti-PLP immunhistochemischer Färbungen. Nach der Remyelinisierungsphase konnte ich eine deutliche Zunahme der PLP-Expression gegenüber der akuten Demyelinisierung nach 5 Wochen feststellen. Abbildung 17 zeigt die anti-PLP Immunreaktivität nach akuter Demyelinisierung und Remyelinisierung im Bereich des medialen CC. Die Mikrogliaaktivierung wurde in anti-IBA1 gefärbten Schnitten untersucht. Wie in Abbildung 17 dargestellt, konnte ich nach der Remyelinisierungsphase eine deutliche Abnahme der IBA1-positive Zellen im Bereich des medialen CC erkennen. Zudem untersuchte ich die Astrozytose im medialen CC nach der Remyelinisierungsphase. Für die Darstellung der Astrozyten wurde der Primärantikörper gegen GFAP verwendet. Auch hier konnte ich eine Abnahme der GFAP-Expression gegenüber der Gruppe der akuten Demyelinisierung feststellen.

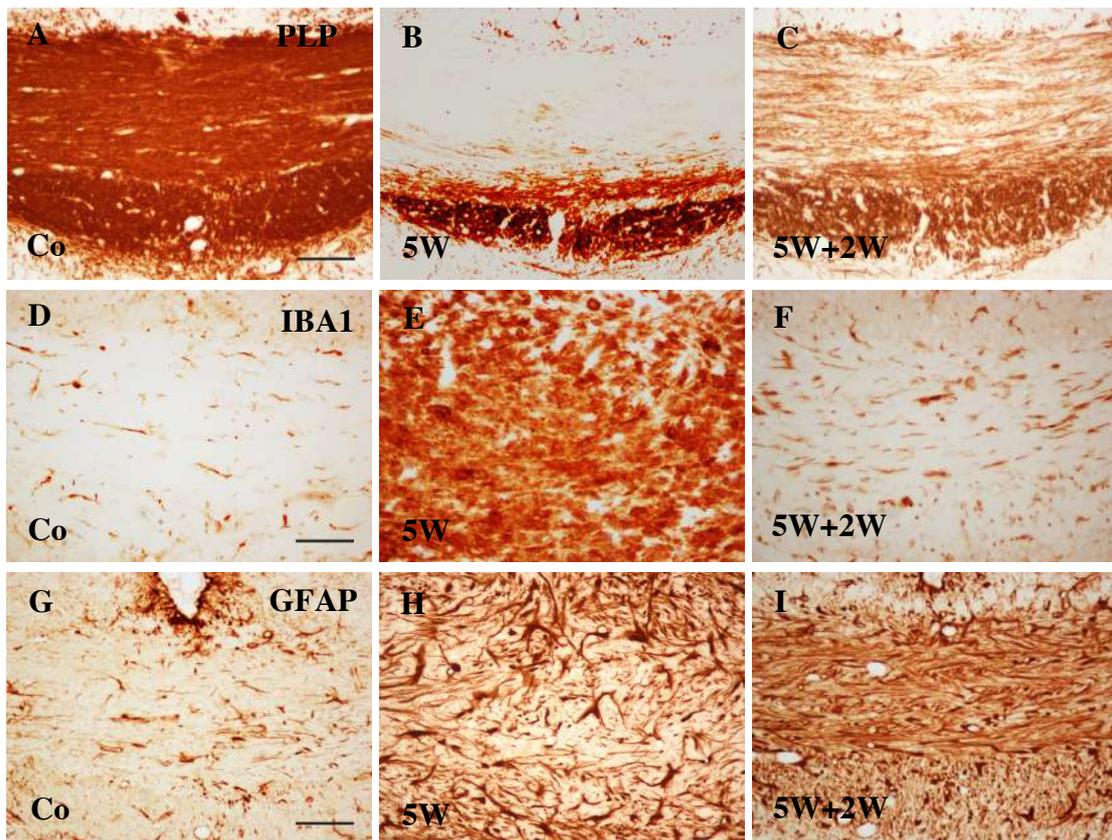


Abbildung 17: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von Proteolipid Protein (PLP), engl. „Ionized calcium binding adaptor molecule 1“ (IBA1) und engl. “Glial fibrillary acidic protein” (GFAP) im Bereich des medialen Corpus Callosum nach der Remyelinisierungsphase

Die Aufnahmen wurden im Bereich des medialen Corpus Callosum (Region 265; (Sidman, 2017)) erstellt. Die Aufnahmen (A), (B) und (C) zeigen anti-PLP; (D), (E) und (F) anti-IBA1 und (G), (H) und (I) anti-GFAP immunhistochemische Färbungen. Die Aufnahme (B) und (C) stellen die akute Demyelinisierung (5W) und die Remyelinisierung (5W+2W) dar. Parallel dazu zeigen die Aufnahmen (E) und (F) bzw. (H) und (I) die Abnahme der Mikrogliaaktivierung und der Astrozytose nach Absetzen des Kupferchelators.

Maßstab: 50µm. Co=Kontrollgruppe; W=Wochen.

Gruppengröße: n=4; Gesamt: 36 Versuchstiere.

Nachdem ich eine Cuprizone-induzierte Abnahme der Ankyrin G-Expression in akut demyelinisierten Läsionen in unseren Versuchstieren nachweisen konnte, untersuchte ich in einem nächsten Schritt die Ankyrin G-Expression in Gehirnen von insgesamt 20 Versuchstieren (Gruppengröße: n=5) nach der Remyelinisierungsphase.

Hierfür wurden wiederum anti-Ankyrin G immunhistochemische Färbungen durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Die Veränderungen der Ankyrin G-Immunreaktivität wurden anhand immunhistochemischer Färbungen im medialen CC nach der Remyelinisierungsphase erfasst und gegenüber der Kontrollgruppe ($39,81 \pm 1,58$ (Mittelwert \pm SEM)) verglichen. Dabei konnte ich insgesamt eine signifikante Abnahme der Ankyrin G-Expression ($20,52 \pm 2,92$ (Mittelwert \pm SEM); $p < 0,001$) im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren feststellen.

In einem weiteren Schritt wurden die anti-Ankyrin G immunhistochemischen Färbungen nach akuter Demyelinisierung ($3,57 \pm 0,75$ (Mittelwert \pm SEM)) gegenüber den anti-Ankyrin G immunhistochemischen Färbungen nach der Remyelinisierungsphase ($20,52 \pm 2,92$ (Mittelwert \pm SEM)) verglichen. Dabei wurde untersucht, ob es nach akuter Demyelinisierung und der darauffolgenden Remyelinisierungsphase wieder zu einer Zunahme der Ankyrin G-Expression in dem zuvor von Demyelinisierung betroffenen Bereich des medialen CC kommt. Wie in Abbildung 18 dargestellt, war nach 2 Wochen der Remyelinisierung eine signifikante Zunahme der Ankyrin G-Expression nachweisbar (p-Wert $< 0,01$).

Insgesamt konnte ich nach der Remyelinisierungsphase eine inkomplette Regeneration der Ankyrin G Expression nachweisen.

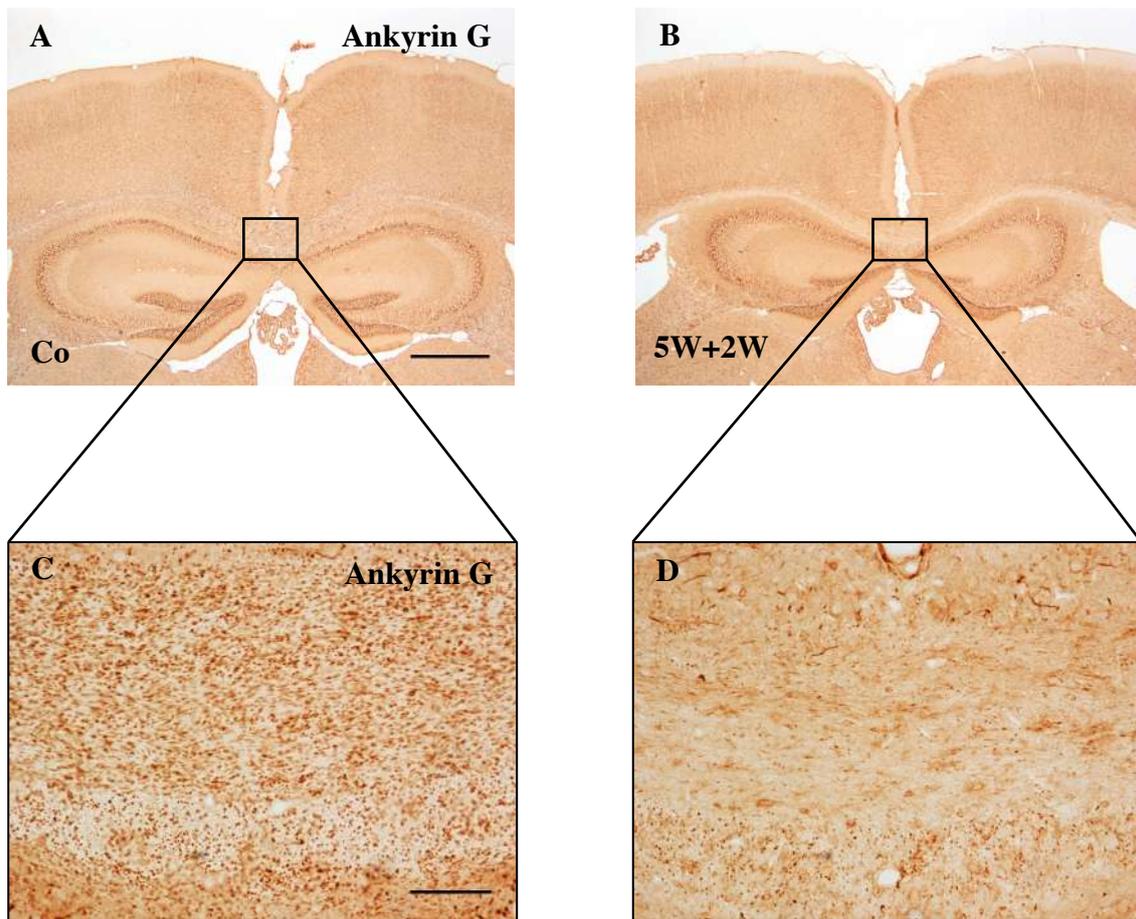


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von Ankyrin G im Bereich des medialen Corpus Callosum nach der Remyelinisierungsphase

Die Aufnahmen wurden in der Frontalebene auf Höhe des rostralen Hippokampus (Region 265) erstellt (Sidman, 2017). Die Abbildungen (A) und (B) sind Übersichtsaufnahmen des medialen Corpus Callosum. (A) und (C) zeigen eine anti-Ankyrin G immunhistochemische Färbung eines Kontrolltiers (7 Wochen Normalfutter). (B) und (D) zeigen die Färbung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation und 2 Wochen Normalfutter. Die Expression von Ankyrin G im medialen Corpus Callosum nimmt nach Cuprizone-Intoxikation gegenüber der Kontrollgruppe ab.

Maßstab: 500µm (A, B) und 50µm (C, D). Co=Kontrollgruppe; W=Wochen
Gruppengröße: n=5; Gesamt: 20 Versuchstiere.

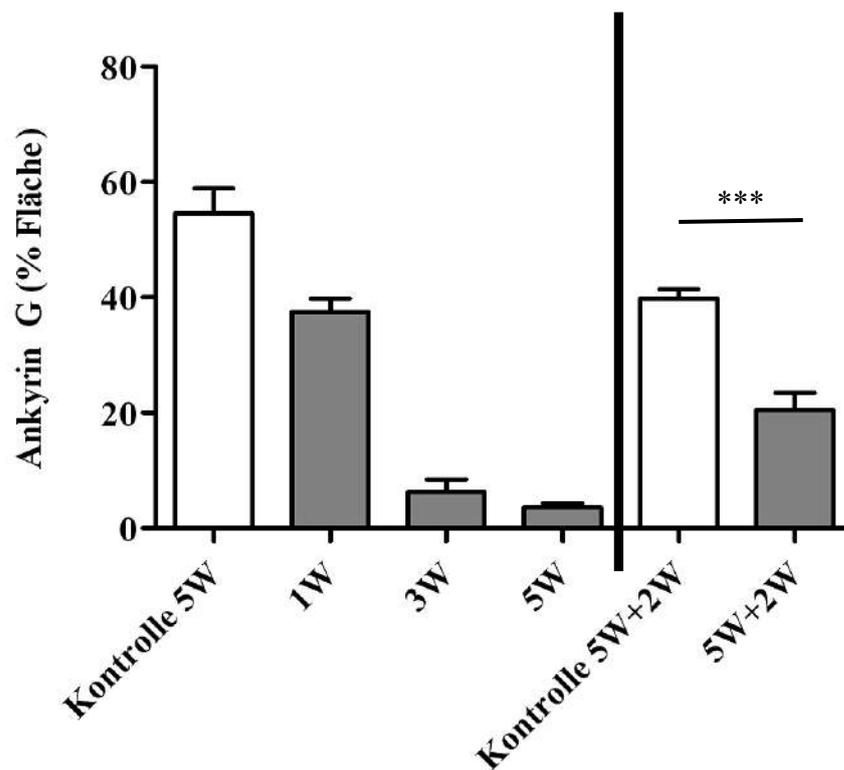


Abbildung 19: Grafische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung der Ankyrin G-Expression (in %)

Das Diagramm zeigt zwei verschiedene immunhistochemische Färbungen der Ankyrin G-Expression. Es wird der prozentuale Anteil der Ankyrin G-positiven Bereiche im medialen Corpus Callosum bei fortlaufender Cuprizone Behandlung (1, 3 und 5 Wochen Behandlung) im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt.

Zudem wird der prozentuale Anteil der Ankyrin G-positiven Bereiche im medialen Corpus Callosum nach der Remyelinisierung (5 Wochen Behandlung und 2 Wochen Normalfutter) im Vergleich zur Kontrollgruppe (7 Wochen Normalfutter (Kontrolle 5W+2W)) und der Gruppe der akuten Demyelinisierung (5W) dargestellt. Insgesamt zeigt das Diagramm die inkomplette Regeneration der Ankyrin G-Expression nach der Remyelinisierungsphase.

P-Wert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

W=Wochen. Gruppengröße: $n=5$ Versuchstiere; Gesamt: 30 Tiere.

2. Beta-IV Spektrin-Expression im Cuprizone- und EAE-Modell

Das AIS dient als spezialisierte Struktur des ZNS der Bildung und Modulation des APs. Die dynamischen Veränderungen, die hier am AIS stattfinden, werden unter dem Begriff der neuronalen Plastizität zusammengefasst und können durch die sensorische Stimulation und Deprivation beeinflusst werden (Jamann et al., 2018). Anhand von IF-Färbungen und der Bestimmung der AIS Länge können die dynamischen Veränderungen im Rahmen der neuronalen Plastizität quantifiziert werden.

In meiner Dissertationsarbeit wurde die AIS Plastizität anhand der Veränderungen der Expression des Gerüstproteins beta-IV Spektrin während der pathophysiologischen Vorgänge der MS untersucht. Dafür wurden das primär degenerative Cuprizone- und das inflammatorische EAE-Modell verwendet. Die sensorische Stimulation und Deprivation wurde im Rahmen des Mausmodells anhand der Reizung bzw. des Entzug des Tastempfindens simuliert (Gruppengröße: n=6).

2.1. Keine Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression bei Cuprizone-induzierter Demyelinisierung und sensorischer Stimulation

In einem ersten Schritt untersuchte ich, ob durch die **Cuprizone**-Intoxikation und sensorische **Stimulation** eine Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression im pScx (Region 265; Schicht II/ III) zu beobachten ist (siehe Abbildung 20). Nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation und sensorischer Stimulation konnte ich keine signifikante Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression ($26,30 \pm 0,70$ (Mittelwert \pm SEM)) gegenüber der Kontrollgruppe ($24,76 \pm 0,76$ (Mittelwert \pm SEM)) nachweisen. Die Länge des AIS veränderte sich bei sensorischer Stimulation im Cuprizone-Modell nicht; dynamische Veränderungen am AIS waren nicht feststellbar.

2.2. Keine Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression nach aktiver EAE-Immunsierung und sensorischer Stimulation

Es wurde die Expression von beta-IV Spektrin im pScx (Region 265; Schicht II/ III) nach aktiver **EAE**-Immunsierung und sensorischer **Stimulation** untersucht. Die EAE wurde durch die Immunsierung mit MOG₃₅₋₅₅-Emulsion und Pertussis Toxin (PTX)-Lösung induziert (siehe Abbildung 20). Dabei konnte ich keine signifikante Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression der behandelten ($24,04 \pm 0,96$ (Mittelwert \pm SEM)) gegenüber der Kontrollgruppe ($24,76 \pm 0,76$ (Mittelwert \pm SEM)) nachweisen. Auch bei sensorischer Stimulation im EAE-Modell veränderte sich die Länge des AIS nicht und es kam zu keiner dynamischen Veränderung des AIS.

2.3. Erhöhte beta-IV Spektrin-Expression bei Cuprizone-induzierter Demyelinisierung und sensorischer Deprivation

In einem nächsten Schritt untersuchte ich die beta-IV Spektrin-Expression bei **Cuprizone**-induzierter Demyelinisierung und sensorischer **Deprivation** der Versuchstiere (siehe Abbildung 20). Dabei konnte ich eine signifikante Zunahme der beta-IV Spektrin-Expression ($25,94 \pm 0,81$ (Mittelwert \pm SEM); $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe ($23,11 \pm 0,47$ (Mittelwert \pm SEM)) feststellen. Es kam zu einer signifikanten Längenänderung des AIS bei sensorischer Deprivation im Cuprizone-Modell, was einen Hinweis auf eine bestehende neuronale Plastizität des AIS gibt.

2.4. Keine Veränderung der beta-IV Spektrin Expression nach aktiver EAE-Immunisierung und sensorischer Deprivation

Zudem untersuchte ich die beta-IV Spektrin-Expression nach aktiver **EAE**-Immunisierung und sensorischer **Deprivation** der Versuchstiere, nachdem ich eine Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression in akut demyelinisierten Läsionen bei sensorisch deprivierten Versuchstieren nachweisen konnte (siehe Abbildung 20). Es wurden die anti-beta-IV Spektrin IF-Färbungen nach EAE-Immunisierung und sensorischer Deprivation gegenüber der Kontrollgruppe ($23,11 \pm 0,47$ (Mittelwert \pm SEM)) verglichen. Dabei konnte ich keine signifikante Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression ($21,27 \pm 1,19$ (Mittelwert \pm SEM)) feststellen. Dynamische Veränderungen des AIS waren nicht erkennbar.

Insgesamt konnte ich keine signifikante Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung oder aktiver EAE-Immunisierung feststellen. Auch die jeweiligen Untersuchungen nach sensorischer Stimulation und Deprivation haben keine signifikanten Veränderungen gezeigt. Es kam zu keiner signifikanten Längenänderung des AIS, das heißt, dass keine Plastizität des AIS in den entsprechenden MS-Tiermodellen stattgefunden hat. Es war allein im Cuprizone-Modell und unter sensorischer Deprivation der Versuchstiere eine signifikante Zunahme der beta-IV Spektrin-Expression nachweisbar, was hier auf eine Rest-AIS Plastizität hindeuten könnte.

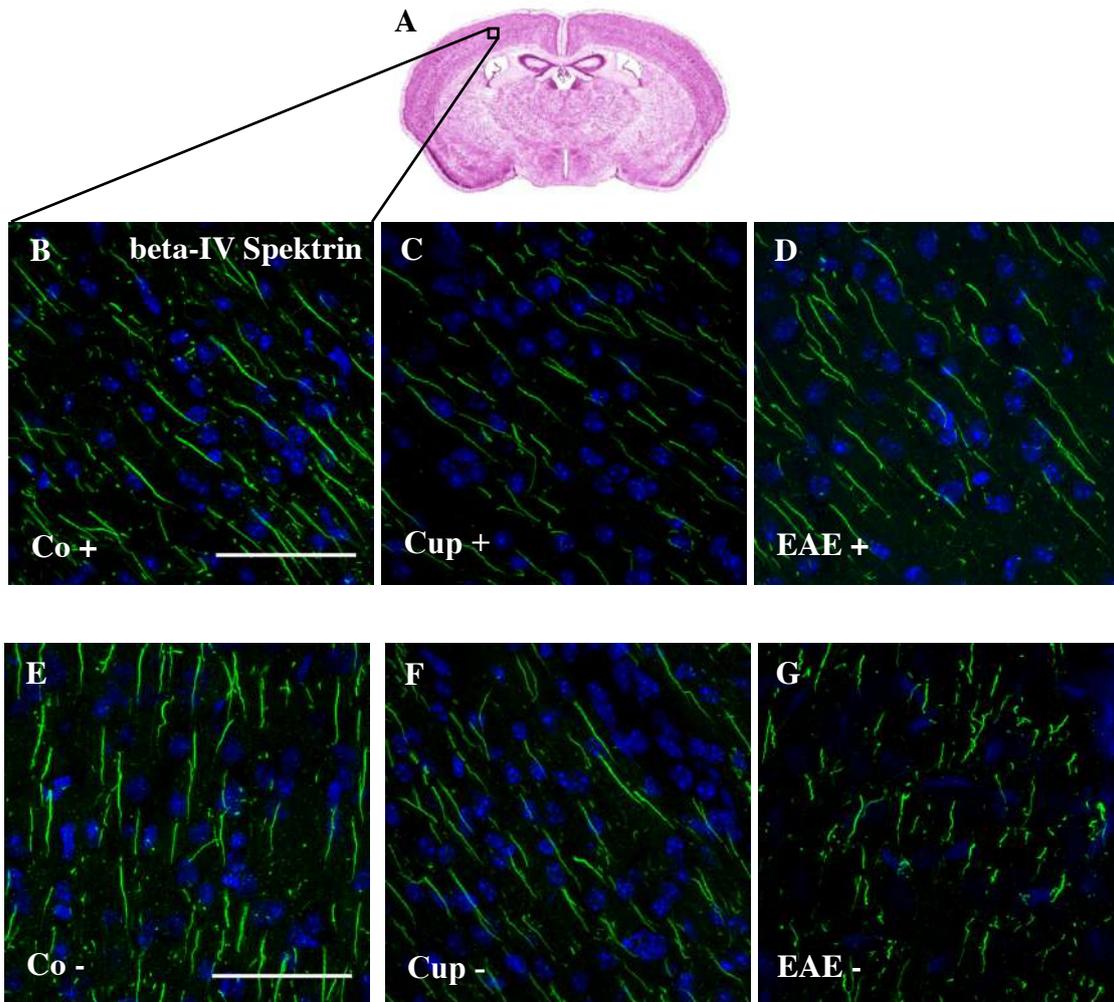


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von beta-IV Spektrin im primär somatosensorischen Kortex (Schicht II/ III) nach 5 Wochen Behandlung

(A) zeigt eine HE-Färbung in der Übersicht (Region 265; (Sidman, 2017)). (B) und (E) zeigen eine anti-beta-IV Spektrin immunhistochemische Färbung des primär-somatosensorischen Kortex eines Kontrolltiers. (C) zeigt die gleiche Färbung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation und sensorischer Stimulation. (D) zeigt die Färbung nach aktiver Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE)-Immunisierung und sensorischer Stimulation. (F) zeigt die Färbung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation und sensorischer Deprivation. (G) zeigt die Färbung nach aktiver EAE-Immunisierung und sensorischer Deprivation. Bei (F) ist eine Zunahme der beta-IV Spektrin-Expression im primär somatosensorischen Kortex nachweisbar, alle weiteren Untersuchungen zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Maßstab: 50µm. Gruppengröße: n=6 Versuchstiere; Gesamt: 36 Versuchstiere.

Co+=Kontrollgruppe Stimulation, Co-=Kontrollgruppe Deprivation,

Cup+=Cuprizone Behandlung und Stimulation, Cup-=Cuprizone Behandlung und Deprivation,

EAE+=EAE Induktion und Stimulation, EAE-=EAE Induktion und Deprivation.

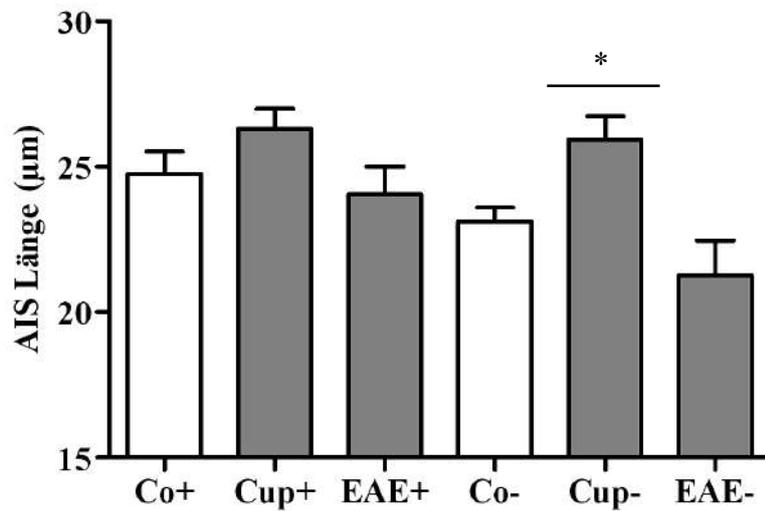


Abbildung 21: Grafische Darstellung der Länge des Axon Initial Segments (in %)

Das Diagramm zeigt die Länge des Axon Initial Segments (gemessen anhand der beta-IV Spektrin-Expression) bei fortlaufender Cuprizone-Intoxikation und aktiver EAE-Immunisierung. (+)-Balken stellen die Behandlung der sensorischen Stimulation, (-)-Balken die Behandlung der sensorischen Deprivation dar. P-Wert: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Gruppengröße: $n=6$ Versuchstiere; Gesamt: 36 Versuchstiere.

Co+=Kontrollgruppe Stimulation, Co-=Kontrollgruppe Deprivation,

Cup+=Cuprizone Behandlung und Stimulation, Cup-=Cuprizone Behandlung und Deprivation,

EAE+=EAE Induktion und Stimulation, EAE-=EAE Induktion und Deprivation.

V. DISKUSSION

1. Die Rolle von Ankyrin G bei neurodegenerativen Prozessen des ZNS

Die MS ist eine autoimmune, chronisch-entzündliche Erkrankung mit einem ausgeprägtem neurodegenerativen Charakter, vor allem in der SPMS und der PPMS. Es kommt sowohl zum Untergang von Nervenzellen, als auch zu immer wiederkehrenden Entzündungsreaktionen, die chronische Schäden am betroffenen Gewebe auslösen. Dabei werden Nervenfasern und -zellen beschädigt, die die Funktionen des ZNS maßgeblich einschränken.

Das Gerüstprotein Ankyrin wurde primär als Bestandteil des Zytoskeletts in Erythrozyten nachgewiesen. Später wurde Ankyrin auch in Nerven- und Muskelzellen entdeckt. Es dient zusammen mit anderen Membranproteinen, wie Spektrin, der Stabilisierung der Zellmembran. Die Unterform Ankyrin G spielt eine wichtige Rolle bei der Verankerung von Na_v^+ -Kanälen an verschiedenen Positionen der Nervenzelle, wie dem AIS und dem Ranvier-Schnürring. Vor allem am Ranvier-Schnürring ermöglicht die hohe Dichte von Ionenkanälen eine schnelle Signaltransduktion. Man spricht auch von der sog. „Saltatorischen Erregungsleitung“ (Huxley & Stampfli, 1949).

Ziel meiner Arbeit war es, die Expression von Ankyrin G im Rahmen der neurodegenerativen Prozesse der MS besser darstellen zu können. Meine Untersuchungen am Cuprizone-Modell konnten zeigen, dass es in experimentellen MS-Läsionen frühzeitig zu einer verminderten Expression von Ankyrin G kommt. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass Ankyrin G auch unabhängig von autoimmunen Prozessen bei neurodegenerativen Vorgängen im ZNS beteiligt ist. Im Vergleich zu anderen histopathologischen Veränderungen (Demyelinisierung, Gliose, Astrozytose, Oligodendrozytenverlust) in akut demyelinisierten Läsionen lag die Abnahme der Ankyrin G-Expression zeitlich vor dem Eintritt der meisten anderen Schäden. Diese waren erst im weiteren Verlauf der Cuprizone Behandlung nachweisbar. Das bestärkt die Annahme, dass Ankyrin G im Rahmen neurodegenerativer Prozesse frühzeitig betroffen ist und auch unabhängig von autoimmunen Prozessen eine regulatorische Funktion bei Demyelinisierungsprozessen im ZNS einnimmt.

Bereits veröffentlichte Studien zur Expression von Ankyrin G am Ranvier-Schnürring konnten auf eine zentrale Rolle des Gerüstproteins im ZNS hinweisen. Devaux und Scherer zeigten, dass die Expression von Ankyrin G in direktem Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Ionenkanälen am Ranvier-Schnürring steht. Dementsprechend führt die Abnahme der Ankyrin G Expression zu einer Abnahme der durch das Gerüstprotein

verankerten Na_v^+ - und Kaliumkanäle (KCNQ2) (Devaux & Scherer, 2005). Der Verlust von Ionenkanälen führt wiederum zu einer verminderten Amplitude des APs und zu einer abgeschwächten Signalübertragung.

Weitere Studien konnten darlegen, dass die Expression von Ankyrin G entlang des Axons, vor allem am AIS, die Polarität der Nervenzelle beeinflusst. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des neuronalen Zytoskeletts aus den einzelnen Gerüstproteinen verändert sich die Polarität der Nervenzelle und es werden unterschiedliche Zellfortsätze ausgebildet. Diese haben im Reizleitungssystem verschiedene Funktionen. Dendriten dienen vor allem der Signalaufnahme, Axone der Signalweiterleitung an nachgeschaltete Nervenzellen. Eine verminderte Expression von Ankyrin G führt zur Veränderung der strukturellen Eigenschaften des Zytoskeletts und zur Ausbildung neuer und anderer Zellfortsätze (Hedstrom, Ogawa, & Rasband, 2008). Die Folgen davon können eine fehlerhafte Signalaufnahme und -weiterleitung sein.

Des Weiteren zeigten Barry et al., dass Gerüstproteine eine wichtige Rolle für den axonalen Transport spielen. Um die Na_v^+ -Kanäle vom Soma zum Axon transportieren zu können, bindet das Motorprotein KIF5/ Kinesin-1 an das Gerüstprotein Ankyrin G. Da durch die Abnahme der Expression von Ankyrin G die notwendigen Ankerproteine entlang des Axons fehlen, wird der Transport durch KIF5/ Kinesin-1 maßgeblich beeinträchtigt (Barry et al., 2014).

Zudem führt die Abnahme der Ankyrin G-Expression zu ultrastrukturellen Veränderungen in der Myelinscheide der Axone. Das kann zur Akkumulation von Zellorganellen im Bereich der Ranvier-Schnürringe führen (Saifetiarova et al., 2017). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Akkumulation von Zellorganellen entlang des Axons oxidativer Stress in der Nervenzelle ausgelöst wird (Ruhling et al., 2019). Insgesamt kann dies zur weiteren Schädigung der Struktur und des Transports des Axons führen und die Apoptose der Nervenzelle induzieren.

Darüber hinaus konnten weitere Studien eine Beteiligung des Gerüstproteins Ankyrin G an den Prozessen der axonalen Reifung und der Entwicklung der Ranvier-Schnürringe belegen.

Insgesamt verläuft die Reifung eines Ranvier-Schnürringes in 3 Schritten:

1. Initiale Organisation (parallel dazu Myelinisierung des Axons und Rekrutierung der notwendigen Proteine),
2. Reifung (Ausbildung stabiler Verbindungen zwischen den einzelnen Gerüstproteinen und Rekrutierung von Na_v^+ -Kanälen),
3. Instandhaltung des Proteinkomplexes am Ranvier-Schnürring (Saifetiarova et al., 2017).

Die initiale Organisation der Ranvier-Schnürringe läuft primär unabhängig von Ankyrin G ab. Ankyrin G spielt im weiteren Verlauf der Reifung und der Stabilisierung der Ranvier-Schnürringe eine wichtige Rolle. Beta-IV Spektrin sorgt dabei für zusätzliche

Stabilität bei der Reifung der Nodien. Es stellt jedoch keine entscheidende Komponente dafür da. Demnach ist Ankyrin G ein essenzieller Faktor für die Entwicklung von Ranvier-Schnürringen. Nodien, die sich in Abwesenheit von Ankyrin G ausbilden, reifen nicht und destabilisieren. Das gibt Hinweise darauf, dass die Abnahme der Ankyrin G-Expression Auswirkungen auf die Reifung und den Erhalt von Ranvier-Schnürringen zeigt und zu einer Abnahme der Funktionsfähigkeit im ZNS führt (Saifetiarova et al., 2017).

Weiterführende Studien beschäftigten sich zudem mit der Frage, ob der Verlust von Ankyrin G durch andere Isoformen aus dem Ankyrin-Proteinkomplex ersetzt werden kann. Untersuchungen von Ho et al. haben gezeigt, dass zwischen Ankyrin G und beta-IV Spektrin eine starre Verbindung besteht. Sobald es zu einem Verlust einer der beiden Strukturen kommt, geht auch die jeweils andere Struktur verloren. Das Ankyrin G/ beta-IV Spektrin System wird durch das Ankyrin R/ beta-I Spektrin Gerüst ersetzt. Ankyrin R und beta-I Spektrin haben eine ähnlich starre Verbindung zueinander wie Ankyrin G mit beta-IV Spektrin (Ho et al., 2014). Obwohl Ankyrin G durch Ankyrin R ersetzt werden kann, spielt die Abnahme der Ankyrin G-Expression dennoch eine Rolle für die Funktionsfähigkeit des ZNS. Ankyrin G hat im Gegensatz zu Ankyrin R eine höhere Affinität zu dem Bindungsprotein NF186 und den Na_v^+ -Kanälen und ist deshalb im ZNS höher exprimiert. Ankyrin R ist vermehrt in Erythrozyten nachweisbar und dient damit der Versorgung des Nervensystems (Kordeli, Davis, Trapp, & Bennett, 1990). Sobald Ankyrin G im ZNS reduziert ist, kann Ankyrin R trotz einer geringeren Affinität zu NF186 und den Na_v^+ -Kanälen binden. Ankyrin R kann jedoch nur die Ankyrin G Proteine am Ranvier-Schnürring, nicht am AIS, ersetzen. Ankyrin G ist am Ranvier-Schnürring und am AIS auf unterschiedliche Weise verankert. Am Ranvier-Schnürring sind dabei extrinsische Faktoren (NF186, Myelinhülle) beteiligt. Am AIS wird Ankyrin G nur über das intraaxonale Zytoskelett (Ankyrin B, alpha-II und beta-II Spektrin) verankert (Ho et al., 2014). Deshalb sind beide Ankyrin Isoformen notwendig, um eine ausreichende Funktionsfähigkeit des ZNS zu gewährleisten (Ho et al., 2014).

Insgesamt wird deutlich, dass Gerüstproteine wie Ankyrin G einen wichtigen Bestandteil der Nervenzelle darstellen und bei zahlreichen Funktionen des ZNS beteiligt sind. Basierend auf den bereits erhobenen Ergebnissen ergeben sich verschiedene Ansatzpunkte für neue Studien auf diesem Gebiet. Im Rahmen der etablierten MS-Tiermodelle sollte primär die Expression von Ankyrin G an den Ranvier-Schnürringen und dem AIS erhoben werden. Dies könnte auf eine Interaktion der beiden spezialisierten, neuronalen Strukturen im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse der MS hinweisen. Des Weiteren muss umfassend überprüft werden, inwieweit die Verminderung der Ankyrin G Expression zu oxidativem Stress in der Nervenzelle führt und einen potentiellen Trigger für andere neurodegenerative Schäden in den betroffenen ZNS

Arealen darstellt. Zudem sollte es Ziel weiterer Forschung sein, die Expression von Ankyrin G auch im Modell der aktiven Immunisierung zu untersuchen, um wichtige Fragen zur Funktion von Ankyrin G bei neuroinflammatorischen Prozessen zu klären und die Ergebnisse zu den neurodegenerativen Vorgängen der MS zu ergänzen.

2. Ist Ankyrin G relevant für die Remyelinisierung?

Die Remyelinisierung ist ein zentrales Element in der endogenen Reparatur des ZNS. Die Schädigung der schützenden Myelinhülle wird in den betroffenen ZNS Arealen durch körpereigene Reparaturmechanismen behoben. Eine ausreichende Wiederherstellung der Myelinisierung ist entscheidend für die Funktionsfähigkeit des ZNS und die schnelle Signalübertragung entlang des Axons (Bruce et al., 2010; Honmou et al., 1996; Moore et al., 2013; Schampel et al., 2017). Der Prozess der Remyelinisierung kann in mehreren Schritten ablaufen und unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Neuroprotektive und -destruktive Faktoren sind maßgebend für die Regenerationsfähigkeit eines Axons. In den verschiedenen Stadien kommt es häufig zu einer fehlerhaften und unvollständigen Remyelinisierung, wenn die Rekrutierung, Proliferation oder Differenzierung von Oligodendrozyten gestört werden (Chang, Nishiyama, Peterson, Prineas, & Trapp, 2000; Chang, Tourtellotte, Rudick, & Trapp, 2002). Die durch die Demyelinisierung entstandenen Defizite können dann nicht mehr ausgeglichen werden.

Das Verständnis der Vorgänge der De- und Remyelinisierung erlangt zunehmend an Bedeutung, da es sich bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der MS, um chronisch-progrediente Krankheiten handelt. Die Möglichkeit der Regeneration ist hier sehr wichtig für die Erforschung neuer Therapiekonzepte.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich die Expression von Ankyrin G in Bezug auf die Remyelinisierungsprozesse im ZNS untersucht. Insgesamt konnte ich nach der Remyelinisierungsphase eine unvollständige Regeneration der Ankyrin G Expression feststellen. Gegenüber der Kontrollgruppe war eine signifikante Abnahme, gegenüber der Gruppe der akuten Demyelinisierung eine signifikante Zunahme der Ankyrin G-Expression nachweisbar. Dies gibt Hinweise dafür, dass die Expression von Ankyrin G während der Remyelinisierung durch die Stabilisierung des Zytoskeletts und der Ionenkanäle einen neuroprotektiven Einfluss hat und sich insgesamt positiv auf den Remyelinisierungsprozess auswirkt.

Aktuelle Studien auf dem Gebiet beschäftigten sich bislang vor allem mit den zugrundeliegenden Mechanismen der Myelinisierung und Remyelinisierung, sowie der Identifikation neuroprotektiver bzw. -destruktiver Faktoren für eine vollständige

Regeneration der Myelinhülle. Die Expression von Gerüstproteinen während des Remyelinisierungsprozesses wurde bisher noch wenig untersucht.

Bereits veröffentlichte Studien weisen insgesamt auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von Gerüstproteinen und Oligodendrozyten im ZNS hin. Mathis et al. haben bereits beschrieben, dass eine verminderte Anzahl von Oligodendrozyten von einer geringeren Expression von Ankyrin G an den Ranvier-Schnürringen begleitet wird (Mathis, Denisenko-Nehrbass, Girault, & Borrelli, 2001). Für die Expression des Gerüstproteins Ankyrin G am Ranvier-Schnürring ist zudem auch eine intakte Verbindung zwischen Axon und Myelinhülle an den Paranodien wichtig (Rasband et al., 1999). Die Paranodien stellen die Begrenzung der Ranvier-Schnürringe dar.

Weiterführende Studien geben Hinweise auf einen Zusammenhang von Gerüstproteinen und Oligodendrozyten im ZNS an remyelinisierten Axonen. Primär war die Ausbildung einer intakten Myelinhülle notwendig, um die Wiederherstellung der axonalen Struktur und Funktion zu induzieren (Eftekharpour et al., 2007; Sasaki et al., 2006). Gerüstproteine wie Ankyrin G sind erst in einem zweiten Schritt während des Aufbaus der Ranvier-Schnürringe wichtig und induzieren die Rekrutierung und Verankerung der Ionenkanäle (Barry et al., 2014; Poliak & Peles, 2003). Zudem ist die Expression von Ankyrin G entscheidend für die Stabilisierung von Ionenkanälen bei weiteren neurodegenerativen Prozessen und axonaler Schädigung (Dugandzija-Novakovic, Koszowski, Levinson, & Shrager, 1995).

Basierend auf diesen Ergebnissen spielen während des Remyelinisierungsprozesses primär die Oligodendrozyten Proliferation und Differenzierung und zu einem späteren Zeitpunkt die Expression von Gerüstproteinen an den Ranvier-Schnürringen eine entscheidende Rolle. Die Expression von Ankyrin G ist wichtig für die Reorganisation der Erregungsleitungssysteme und zeigt insgesamt einen neuroprotektiven Einfluss auf den Remyelinisierungsprozess.

Für neue Erkenntnisse über die Expression von Ankyrin G und das Zusammenspiel von Ionenkanälen, Gerüstproteinen und Oligodendrozyten im ZNS während der Remyelinisierungsphase würde ich weitere Untersuchungen am toxischen Demyelinisierungsmodell Cuprizone durchführen. Dafür sollte im Rahmen meiner Untersuchungen primär die Expression von Ankyrin G nach akuter Demyelinisierung und Remyelinisierung in einer gemeinsamen immunhistochemischen Färbung erfasst werden. Insgesamt sollte es Ziel weiterer Forschung sein, die Beteiligung von Gerüstproteinen an den Vorgängen der Remyelinisierung zu verstehen und alle potentiellen Trigger für weitere Reparaturvorgänge zu identifizieren.

3. Der Einfluss der sensorischen Stimulation und Deprivation auf beta-IV Spektrin im Cuprizone- und EAE-Modell

Beta-IV Spektrin gehört wie Ankyrin G zu den Gerüstproteinen und ist ein essentieller Bestandteil des Zytoskeletts. Zusammen mit Ankyrin G dient es der Stabilisierung der Zellmembran und der Verankerung von Ionenkanälen an verschiedenen Positionen des axonalen Zytoskeletts. Das AIS ist als eine spezialisierte Struktur der Nervenzelle an der Bildung und Modulation des APs beteiligt. Die dynamischen Veränderungen am AIS, die bei der Beeinflussung der Netzwerkaktivität im ZNS stattfinden, werden als neuronale Plastizität beschrieben. Studien der Arbeitsgruppe Engelhardt beschäftigten sich bereits mit der Plastizität des AIS. Hierbei konnte am engl. „whisker-to-barrel cortex-pathway“ gezeigt werden, dass sich bei sensorischer Stimulation bzw. Deprivation die Länge des AIS im pScx physiologisch verändert. Die sensorische Stimulation führte zu einer Verkürzung, die Deprivation zu einer Verlängerung des AIS (Jamann et al., 2018). Die Länge des AIS wird anhand der Expression von beta-IV Spektrin gemessen. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Engelhardt geben Hinweise darauf, dass übermäßige Signalschwankungen durch den Ein- und Ausbau von Ionenkanälen am AIS ausgeglichen werden können. Dementsprechend kommt es bei sensorischer Stimulation zu einer intrasystemischen Signalabschwächung und bei Deprivation zu einer Signalverstärkung.

Insgesamt beschäftigten sich aktuelle Studien bisher noch wenig mit der Expression von beta-IV Spektrin in Zusammenhang mit der AIS Plastizität im Cuprizone- und EAE-Modell. Es war Fokus meiner Arbeit, aufbauend auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Engelhardt, die Expression des Gerüstproteins beta-IV Spektrin in den entsprechenden MS-Tiermodellen genauer zu untersuchen. Dabei soll gezeigt werden, ob die Plastizität des AIS auch nach toxisch-induzierter Demyelinisierung und autoimmuner Inflammation erhalten ist.

Im Rahmen meiner Untersuchungen am Cuprizone-Modell konnte ich keine signifikante Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression feststellen. Es waren keine AIS Längenänderungen und keine AIS Plastizität nachweisbar. Es war nur bei sensorischer Deprivation im selben Tiermodell eine signifikante Zunahme der beta-IV Spektrin-Expression erkennbar. Das könnte Hinweise auf eine Rest-Plastizität des AIS im toxischen Demyelinisierungsmodell Cuprizone geben.

Es stellt sich die Frage, ob die Zunahme der beta-IV Spektrin Expression durch die fehlende Myelinhülle am AIS im Rahmen der toxisch induzierten Demyelinisierung begründet werden kann. Zum einen spricht dagegen, dass so insgesamt eine signifikante Verlängerung des AIS im Cuprizone-Modell gegenüber der Kontrollgruppe nachweisbar sein müsste. Die Verlängerung des AIS müsste dabei unabhängig von den Veränderungen bei sensorischen Stimulation bzw. Deprivation sein. Zum anderen spricht dagegen, dass es insgesamt nicht zu einer distalen Erweiterung des AIS kommt, sondern zu einer

proximalen Erweiterung in Richtung des Axonhügels. Hier ist physiologisch keine Myelinisierung vorhanden (Hamada & Kole, 2015). Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Längenveränderung des AIS nicht auf die Cuprizone induzierte Demyelinisierung zurückgeführt werden.

Neben der Untersuchung der Längenveränderungen des AIS im Cuprizone-Modell, beschäftigten sich weitere Studien mit der Umverteilung der am AIS verankerten Ionenkanäle (Hamada & Kole, 2015). Insgesamt konnte eine verminderte Dichte der Na_v^+ -Kanäle und der Kaliumkanäle (Kv 7.3) am AIS nachgewiesen werden. Dadurch ist die Erregbarkeit des AIS reduziert und die Amplitude des APs vermindert (Hamada & Kole, 2015). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei toxisch induzierter Demyelinisierung eine geringere Anzahl von Ionenkanälen über dieselbe Strecke am AIS verteilt wird. Die Signalübertragung im ZNS wäre dadurch zusätzlich beeinträchtigt.

Im Rahmen meiner Untersuchungen nach aktiver EAE-Immunsierung konnte ich insgesamt keine Veränderung der beta-IV Spektrin-Expression feststellen, weder nach sensorischer Stimulation noch nach Deprivation. Es konnte im Rahmen der autoimmunen Inflammation keine neuronale Plastizität des AIS nachgewiesen werden.

Weiterführende Studien, die sich bereits mit den Veränderungen des AIS nach EAE-Immunsierung auseinandergesetzt haben, weisen auf eine verminderte Anzahl und Länge des AIS nach autoimmuner Inflammation hin (Clark et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass die Struktur des AIS nach EAE-Induktion geschädigt ist, was erklären könnte, warum hier keine AIS Plastizität nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse von Clark et. al basieren auf immunhistochemischen Färbungen des Gerüstproteins Ankyrin G. Dennoch geben die Untersuchungen Hinweise dafür, dass das AIS im Rahmen der inflammatorischen Prozesse der MS betroffen ist.

Insgesamt konnte ich die Ergebnisse der bereits veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe Engelhardt nicht bestätigen. Die aktivitätsabhängigen Unterschiede der AIS Länge, wie die AIS Verkürzung nach sensorischer Stimulation und die AIS Verlängerung nach sensorischer Deprivation, konnte ich im Rahmen meiner Untersuchungen nicht nachweisen. Die widersprüchliche Datenlage nach der Auswertung meiner Ergebnisse und den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Engelhardt kann auf eine verminderte Plastizität des AIS bei neurodegenerativen und inflammatorischen Prozesse hinweisen. Da hier wichtige Funktionen, wie die Stabilisierung des Zytoskeletts, der Ein- und Ausbau von Ionenkanälen und die Signalweiterleitung am AIS verloren gehen können, muss die AIS Plastizität im Cuprizone- und EAE-Modell weiterhin umfassend überprüft werden. Für neue Erkenntnisse über die AIS Länge würde ich in einem nächsten Versuch auch die Expression des Gerüstproteins Ankyrin G am AIS untersuchen und auswerten. Um genauere Aussagen zur Expression von beta-IV Spektrin im EAE-Modell treffen zu können, würde ich zudem Untersuchungen an anderen Lokalisationen des ZNS

durchführen. Die Folgen der T-Zell abhängigen Immunantwort nach EAE-Induktion sind vorwiegend im Kleinhirn und Rückenmark zu beobachten, selten können EAE-Herde im Kortex nachgewiesen werden. Deshalb würde ich rückblickend weitere Versuche an Gewebeschnitten des Kleinhirns und Rückenmarks durchführen. In diesen Regionen des ZNS konnte bereits nachweislich eine Veränderung der neuronalen Strukturen verifiziert werden. Dementsprechend könnten auch hier genauere Aussagen zum Einfluss der EAE-Immunisierung auf die Plastizität des AIS getroffen werden.

Insgesamt konnte im Rahmen experimentell induzierter MS-Läsionen gezeigt werden, dass es begleitend zu einer reaktiven Gliose und Astrozytose bei fortlaufender Demyelinisierung primär zu einer Verminderung der Ankyrin G-Expression im medialen CC kommt. Das gibt Hinweise auf eine frühe Beteiligung von Ankyrin G an der Axondegeneration, Schädigung des Zytoskeletts und Destabilisierung von Ionenkanälen am Ranvier-Schnürring, unabhängig von einer autoimmun induzierten Inflammation.

Zudem konnte ich nachweisen, dass es sowohl im Cuprizone- als auch im EAE-Modell zu keiner Veränderung der Expression von beta-IV Spektrin im pScx kommt. Erst bei sensorischer Deprivation der Versuchstiere im Rahmen des toxischen Demyelinisierungsmodells Cuprizone war eine signifikante Zunahme der beta-IV Spektrin-Expression nachweisbar. Dies kann auf eine verminderte bis fehlende Plastizität des AIS im Rahmen der neurodegenerativen und inflammatorischen Prozesse hinweisen. Um Aussagen zur Beteiligung von Ankyrin G an inflammatorischen Prozessen präzisieren zu können, müssen weitere Untersuchungen am Tiermodell der aktiven Immunisierung durchgeführt werden. Die bereits erhobenen Ergebnisse zur toxisch induzierter Demyelinisierung geben Hinweise darauf, dass die frühe Veränderung der Ankyrin G-Expression die Entstehung neurodegenerativer Prozesse der MS triggern könnte. Mit Ankyrin G als Ansatzpunkt neuer Therapiemethoden könnte man möglicherweise schon früh in den Entstehungsprozess eingreifen und die Krankheitsprogression reduzieren. Wichtige Fragen zur Rolle von beta-IV Spektrin im Rahmen der axonalen Plastizität und der pathophysiologischen Vorgängen der MS müssen ebenfalls in weiterführenden Studien untersucht werden. Es muss immer noch konkretisiert werden, inwieweit beta-IV Spektrin daran beteiligt ist, dass die AIS Plastizität im MS-Tiermodell nicht mehr vollständig funktioniert. Für neue Erkenntnisse würde ich weitere Untersuchungen am EAE-Modell an anderen Lokalisationen des ZNS, wie dem Kleinhirn und Rückenmark, durchführen. Hier zeigen sich nachweislich histopathologische Veränderung der aktiven Immunisierung und es könnten auch wichtige Veränderungen der beta-IV Spektrin-Expression identifiziert werden.

Diese Untersuchungen von Ankyrin G und beta-IV Spektrin im MS-Tiermodell könnten die Basis für neue Therapieansätze bilden, die die Funktion von Ankyrin G und beta-IV Spektrin als Gerüstproteine aufrechterhalten und dadurch einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf erzielen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose ist eine chronische, entzündlich-degenerative Erkrankung, die durch multifokal auftretende Herde im Zentralnervensystem gekennzeichnet ist. Das primär degenerative Cuprizone- und das inflammatorische Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis stellen die verschiedenen Aspekte der Erkrankung dar. Aktuelle Studien auf dem Gebiet der experimentellen Multiple Sklerose-Forschung beschrieben bereits Schäden an unterschiedlichen Strukturen des Zentralnervensystems, wie dem Axon und der Synapse. Im Rahmen meiner Arbeit untersuchte ich die beiden Gerüstproteine Ankyrin G und beta-IV Spektrin. Beide sind wichtige Bestandteile des zentralen Reizleitungssystems und werden an den Ranvier-Schnürringen und dem Axon Initial Segment exprimiert. Vor allem am Axon Initial Segment kann die Expression von Gerüstproteinen in Abhängigkeit von der umgebenden Netzwerkaktivität verändert werden, was als neuronale Plastizität beschrieben wird.

Primär beschäftigte ich mich mit der Frage, ob in der Frühphase der Cuprizone-Intoxikation Veränderungen der Expression von Ankyrin G an den Ranvier-Schnürringen auftreten. Zudem beschäftigte ich mich mit der Frage, ob die aktivitätsabhängige Plastizität des Axon Initial Segments auch bei den beiden etablierten Multiple-Sklerose Tiermodellen beobachtet werden kann.

Dafür verwendete ich das Cuprizone- und das Modell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis. Für die Darstellung der Veränderungen an den Ranvier-Schnürringen und dem Axon Initial Segment wurden immunhistochemische Färbungen der Gerüstproteine Ankyrin G und beta-IV Spektrin durchgeführt. Zusätzlich wurde die Expression von beta-IV Spektrin nach sensorischer Stimulation und Deprivation untersucht.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen an den Ranvier-Schnürringen zeigten in den ersten Wochen der Cuprizone-Behandlung eine frühe Abnahme der Ankyrin G-Expression, die zeitlich vor anderen neurodegenerativen Schäden, wie der Demyelinisierung, Gliose, Astrozytose und dem Oligodendrozytenverlust, eingetreten ist. Im Rahmen meiner Untersuchungen am Axon Initial Segment konnte ich nahezu keine signifikante Expressionsänderung von beta-IV Spektrin in den Multiple Sklerose-Tiermodellen feststellen. Eine aktivitätsabhängige Plastizität des Axon Initial Segments war kaum nachweisbar.

Insgesamt konnte ich zeigen, dass Ranvier-Schnürringe unabhängig von autoimmunen Prozessen in Läsionen der Multiplen Sklerose frühzeitig betroffen sind und weitere degenerative Veränderungen potentiell triggern können. Zudem geben meine Ergebnisse Hinweise darauf, dass die Plastizität des Axon Initial Segments nach degenerativen und inflammatorischen Prozessen nicht mehr vollständig aufrechterhalten werden kann. Wäre es möglich, die Expression von Gerüstproteinen im Zentralnervensystem zu erhalten, könnte dies ein möglicher Therapieansatz in der Behandlung der Multiplen Sklerose sein.

VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose..	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung der somatodendritischen Domäne des Neurons.	19
Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis von beta-IV Spektrin im somatosensorischen Kortex.....	21
Abbildung 4: Tasthaare der Maus: (A) zeigt die supraorbitalen Tasthaare und die labialen Tasthaare (B) zeigt die rhinalen Tasthaare und das infraorbitale Tasthaar.....	31
Abbildung 5: Prinzip der Immunhistochemie (ABC-Methode).....	32
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung.....	38
Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von Ankyrin G im medialen Corpus Callosum (CC).....	42
Abbildung 8: Darstellung der in der Studie analysierten Gehirnregionen im Cuprizone- und Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis-Modell.....	43
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Ausmessung des Axon Initial Segments..	44
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Histogramms.....	44
Abbildung 11: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von Proteolipid-Protein (PLP) im medialen Corpus Callosum nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation.....	48
Abbildung 12: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von engl. „Ionized calcium binding adaptor molecule 1“ (IBA1) im medialen Corpus Callosum nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation.....	49
Abbildung 13: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von engl. “Glial fibrillary acidic protein” (GFAP) im medialen Corpus Callosum nach 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation.....	50
Abbildung 14: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von engl. „Oligodendrocyte transcription factor 2“ (OLIG2) im medialen Corpus Callosum nach 1 Woche.....	51
Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von Ankyrin G im medialen Corpus Callosum nach verschiedenen Phasen der Cuprizone-Intoxikation.....	53
Abbildung 16: Grafische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung der Ankyrin G-Expression (in %).....	54
Abbildung 17: Qualitative Studie zum immunhistochemischen Nachweis von Proteolipid Protein (PLP), engl. „Ionized calcium binding adaptor molecule 1“ (IBA1) und engl. „Glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) im Bereich des medialen Corpus Callosum nach der Remyelinisierungsphase.....	55
Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von Ankyrin G im Bereich des medialen Corpus Callosum nach der Remyelinisierungsphase.....	57

Abbildung 19: Grafische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung der Ankyrin G-Expression (in %). Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von Ankyrin G im medialen Corpus Callosum bei fortlaufender Cuprizone Behandlung. P-Wert: * p < 0,05; ** p < 0,01 und *** p < 0,001.....	58
Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von beta-IV Spektrin im primär somatosensorischen Kortex (Schicht II/ III) nach 5 Wochen Behandlung	61
Abbildung 21: Grafische Darstellung der Länge des Axon Initial Segments (in %)	62

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Stufentherapie der Multiplen Sklerose (nach der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2014).....	13
Tabelle 2: Zugelassene Wirkstoffe in der Therapie der Multiplen Sklerose (nach der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2014).....	15
Tabelle 3: Materialliste	26
Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper.....	27
Tabelle 5: Geräteliste	28
Tabelle 6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....	33
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien.....	34
Tabelle 8: Blockierungslösung.....	35
Tabelle 9: Protokoll der immunhistochemischen Färbung	37
Tabelle 10: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....	39
Tabelle 11: Verwendete Chemikalien.....	39
Tabelle 12: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung.....	41

IX. LITERATURVERZEICHNIS

- Alastair Compston, C. C., Hans Lassmann, Ian McDonald, David Miller, John Noseworthy, Kenneth Smith, Hartmut Wekerle. (2006). The story of multiple sclerosis *Mc Alpine's Multiple Sclerosis*.
- Allen, S. J., Baker, D., O'Neill, J. K., Davison, A. N., & Turk, J. L. (1993). Isolation and characterization of cells infiltrating the spinal cord during the course of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Biozzi AB/H mouse. *Cell Immunol*, *146*(2), 335-350. doi:10.1006/cimm.1993.1031
- Arnett, H. A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G. K., & Ting, J. P. (2001). TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci*, *4*(11), 1116-1122. doi:10.1038/nn738
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2010). Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol*, *5*(3), 271-277. doi:10.1007/s11481-010-9201-3
- Ascherio, A., Munger, K. L., Lennette, E. T., Spiegelman, D., Hernan, M. A., Olek, M. J., . . . Hunter, D. J. (2001). Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*, *286*(24), 3083-3088. doi:10.1001/jama.286.24.3083
- Back, S. A., Tuohy, T. M., Chen, H., Wallingford, N., Craig, A., Struve, J., . . . Sherman, L. S. (2005). Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med*, *11*(9), 966-972. doi:10.1038/nm1279
- Baker, D., O'Neill, J. K., Gschmeissner, S. E., Wilcox, C. E., Butter, C., & Turk, J. L. (1990). Induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Biozzi mice. *J Neuroimmunol*, *28*(3), 261-270.
- Barcellos, L. F., Sawcer, S., Ramsay, P. P., Baranzini, S. E., Thomson, G., Briggs, F., . . . Oksenberg, J. R. (2006). Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*, *15*(18), 2813-2824. doi:10.1093/hmg/ddl223
- Barry, J., Gu, Y., Jukkola, P., O'Neill, B., Gu, H., Mohler, P. J., . . . Gu, C. (2014). Ankyrin-G directly binds to kinesin-1 to transport voltage-gated Na⁺ channels into axons. *Dev Cell*, *28*(2), 117-131. doi:10.1016/j.devcel.2013.11.023
- Baxter, A. G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*, *7*(11), 904-912. doi:10.1038/nri2190
- Bender. (2015). *Kurzlehrbuch Neurologie*. München Elsevier GmbH.
- Bender, K. J., & Trussell, L. O. (2012). The physiology of the axon initial segment. *Annu Rev Neurosci*, *35*, 249-265. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150339
- Berlucchi, G., & Buchtel, H. A. (2009). Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Exp Brain Res*, *192*(3), 307-319. doi:10.1007/s00221-008-1611-6
- Brock, L. G., Coombs, J. S., & Eccles, J. C. (1953). Intracellular recording from antidromically activated motoneurons. *J Physiol*, *122*(3), 429-461.
- Bruce, C. C., Zhao, C., & Franklin, R. J. (2010). Remyelination - An effective means of neuroprotection. *Horm Behav*, *57*(1), 56-62. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.06.004
- Buchtel, H. A. (1978). On defining neural plasticity. *Arch Ital Biol*, *116*(3-4), 241-247.
- Buschmann, J. P., Berger, K., Awad, H., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2012). Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *J Mol Neurosci*, *48*(1), 66-76. doi:10.1007/s12031-012-9773-x
- Chang, A., Nishiyama, A., Peterson, J., Prineas, J., & Trapp, B. D. (2000). NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, *20*(17), 6404-6412.
- Chang, A., Tourtellotte, W. W., Rudick, R., & Trapp, B. D. (2002). Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, *346*(3), 165-173. doi:10.1056/NEJMoa010994

- Clark, K. C., Josephson, A., Benusa, S. D., Hartley, R. K., Baer, M., Thummala, S., . . . Dupree, J. L. (2016). Compromised axon initial segment integrity in EAE is preceded by microglial reactivity and contact. *Glia*, *64*(7), 1190-1209. doi:10.1002/glia.22991
- Coombs, J. S., Curtis, D. R., & Eccles, J. C. (1957). The interpretation of spike potentials of motoneurons. *J Physiol*, *139*(2), 198-231.
- Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft, B. e. V., Hannover (2019). Geschichte der MS. Retrieved 24.12.2018. <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose-infos/geschichte-der-ms/jahreszahlen/1838/>
- Devaux, J. J., & Scherer, S. S. (2005). Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *J Neurosci*, *25*(6), 1470-1480. doi:10.1523/JNEUROSCI.3328-04.2005
- Diamond, M. E., Armstrong-James, M., & Ebner, F. F. (1993). Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(5), 2082-2086. doi:10.1073/pnas.90.5.2082
- Draheim, T., Liessem, A., Scheld, M., Wilms, F., Weissflog, M., Denecke, B., . . . Clarner, T. (2016). Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia*, *64*(12), 2219-2230. doi:10.1002/glia.23058
- Dugandzija-Novakovic, S., Koszowski, A. G., Levinson, S. R., & Shrager, P. (1995). Clustering of Na⁺ channels and node of Ranvier formation in remyelinating axons. *J Neurosci*, *15*(1 Pt 2), 492-503.
- Dzhashiashvili, Y., Zhang, Y., Galinska, J., Lam, I., Grumet, M., & Salzer, J. L. (2007). Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. *The Journal of Cell Biology*, *177*(5), 857-870.
- Eftekharpour, E., Karimi-Abdolrezaee, S., Wang, J., El Beheiry, H., Morshead, C., & Fehlings, M. G. (2007). Myelination of congenitally dysmyelinated spinal cord axons by adult neural precursor cells results in formation of nodes of Ranvier and improved axonal conduction. *J Neurosci*, *27*(13), 3416-3428. doi:10.1523/JNEUROSCI.0273-07.2007
- Faizi, M., Salimi, A., Seydi, E., Naserzadeh, P., Kouhnavard, M., Rahimi, A., & Pourahmad, J. (2016). Toxicity of cuprizone a Cu(2+) chelating agent on isolated mouse brain mitochondria: a justification for demyelination and subsequent behavioral dysfunction. *Toxicol Mech Methods*, *26*(4), 276-283. doi:10.3109/15376516.2016.1172284
- Fraser, K. B., Haire, M., Millar, J. H., & McCrea, S. (1979). Increased tendency to spontaneous in-vitro lymphocyte transformation in clinically active multiple sclerosis. *Lancet*, *2*(8145), 175-176.
- Glazewski, S. (1998). Experience-dependent changes in vibrissae evoked responses in the rodent barrel cortex. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *58*(4), 309-320.
- Goldberg, E. M., Clark, B. D., Zagha, E., Nahmani, M., Erisir, A., & Rudy, B. (2008). K⁺ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron*, *58*(3), 387-400. doi:10.1016/j.neuron.2008.03.003
- Grant, W. B. (2006). Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol*, *92*(1), 65-79. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.013
- Gutzmann, A., Ergul, N., Grossmann, R., Schultz, C., Wahle, P., & Engelhardt, M. (2014). A period of structural plasticity at the axon initial segment in developing visual cortex. *Front Neuroanat*, *8*, 11. doi:10.3389/fnana.2014.00011
- Hamada, M. S., & Kole, M. H. (2015). Myelin loss and axonal ion channel adaptations associated with gray matter neuronal hyperexcitability. *J Neurosci*, *35*(18), 7272-7286. doi:10.1523/JNEUROSCI.4747-14.2015
- Hedstrom, K. L., Ogawa, Y., & Rasband, M. N. (2008). AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol*, *183*(4), 635-640. doi:10.1083/jcb.200806112

- Hiremath, M. M., Saito, Y., Knapp, G. W., Ting, J. P., Suzuki, K., & Matsushima, G. K. (1998). Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*, *92*(1-2), 38-49.
- Ho, T. S.-Y., Zollinger, D. R., Chang, K.-J., Xu, M., Cooper, E. C., Stankewich, M. C., . . . Rasband, M. N. (2014). A HIERARCHY OF ANKYRIN/SPECTRIN COMPLEXES CLUSTERS SODIUM CHANNELS AT NODES OF RANVIER. *Nature Neuroscience*, *17*(12), 1664–1672.
- Honmou, O., Felts, P. A., Waxman, S. G., & Kocsis, J. D. (1996). Restoration of normal conduction properties in demyelinated spinal cord axons in the adult rat by transplantation of exogenous Schwann cells. *J Neurosci*, *16*(10), 3199-3208.
- Hooke Laboratories, I. (2008). EAE Induction by Active Immunization in C57BL/6 Mice. Retrieved from https://hookelabs.com/protocols/eaeAI_C57BL6.html
- Hu, W., Tian, C., Li, T., Yang, M., Hou, H., & Shu, Y. (2009). Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci*, *12*(8), 996-1002. doi:10.1038/nn.2359
- Huxley, A. F., & Stampfli, R. (1949). Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J Physiol*, *108*(3), 315-339.
- Islam, T., Gauderman, W. J., Cozen, W., & Mack, T. M. (2007). Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology*, *69*(4), 381-388. doi:10.1212/01.wnl.0000268266.50850.48
- Jamann, N., Jordan, M., & Engelhardt, M. (2018). Activity-dependent axonal plasticity in sensory systems. *Neuroscience*, *368*, 268-282. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.07.035
- Keegan, B. M., & Noseworthy, J. H. (2002). Multiple sclerosis. *Annu Rev Med*, *53*, 285-302. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103909
- Kipp, M., & Beyer, C. (2009). Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. *Front Neuroendocrinol*, *30*(2), 188-200. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.004
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*, *118*(6), 723-736. doi:10.1007/s00401-009-0591-3
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol*, *27*(2), 123-137. doi:10.1111/bpa.12454
- Kole, M. H., & Stuart, G. J. (2012). Signal processing in the axon initial segment. *Neuron*, *73*(2), 235-247. doi:10.1016/j.neuron.2012.01.007
- Konorski, J. (1948). Conditioned Reflexes and Neuron Organization. V Excitability and plasticity in the nervous system [Press release]
- Kordeli, E., Davis, J., Trapp, B., & Bennett, V. (1990). An isoform of ankyrin is localized at nodes of Ranvier in myelinated axons of central and peripheral nerves. *J Cell Biol*, *110*(4), 1341-1352.
- Kotter, M. R., Li, W. W., Zhao, C., & Franklin, R. J. (2006). Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci*, *26*(1), 328-332. doi:10.1523/JNEUROSCI.2615-05.2006
- Lacas-Gervais, S., Guo, J., Strenzke, N., Scarfone, E., Kolpe, M., Jahkel, M., . . . Solimena, M. (2004). BetaVSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments. *J Cell Biol*, *166*(7), 983-990. doi:10.1083/jcb.200408007
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., & Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*, *172*(1), 3-13. doi:10.1016/j.neurol.2015.10.006
- Mason, J. L., Suzuki, K., Chaplin, D. D., & Matsushima, G. K. (2001). Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci*, *21*(18), 7046-7052.
- Mathis, C., Denisenko-Nehrbass, N., Girault, J. A., & Borrelli, E. (2001). Essential role of oligodendrocytes in the formation and maintenance of central nervous system nodal regions. *Development*, *128*(23), 4881-4890.

- Mattle, H., & Mumenthaler, M. (2002). *Kurzlehrbuch Neurologie* (Vol. 3). Deutschland: Georg Thieme Verlag KG.
- Montalban, X., Gold, R., Thompson, A. J., Otero-Romero, S., Amato, M. P., Chandraratna, D., . . . Zipp, F. (2018).ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Mult Scler*, *24*(2), 96-120. doi:10.1177/1352458517751049
- Moore, S., Khalaj, A. J., Yoon, J., Patel, R., Hannsun, G., Yoo, T., . . . Tiwari-Woodruff, S. K. (2013). Therapeutic laquinimod treatment decreases inflammation, initiates axon remyelination, and improves motor deficit in a mouse model of multiple sclerosis. *Brain Behav*, *3*(6), 664-682. doi:10.1002/brb3.174
- Mumenthaler, H. M. M. (2002). *Grundkurs Neurologie*: Georg Thieme Verlag
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, *296*(23), 2832-2838. doi:10.1001/jama.296.23.2832
- Nelson, A. D., & Jenkins, P. M. (2017). Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier. *Front Cell Neurosci*, *11*, 136. doi:10.3389/fncel.2017.00136
- O'Neill, J. K., Baker, D., Morris, M. M., Gschmeissner, S. E., Jenkins, H. G., Butt, A. M., . . . Amor, S. (1998). Optic neuritis in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Biozzi ABH mice: demyelination and fast axonal transport changes in disease. *J Neuroimmunol*, *82*(2), 210-218.
- Olek, M. J. (2016). Clinical course and classification of multiple sclerosis. Retrieved Oktober 17, 2017. https://www.uptodate.com/contents/clinical-course-and-classification-of-multiple-sclerosis?source=search_result&search=multiple%20sklerose&selectedTitle=1~150
- Palmer, L. M., & Stuart, G. J. (2006). Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci*, *26*(6), 1854-1863. doi:10.1523/JNEUROSCI.4812-05.2006
- Patrikios, P., Stadelmann, C., Kutzelnigg, A., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., . . . Lassmann, H. (2006). Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*, *129*(Pt 12), 3165-3172. doi:10.1093/brain/awl217
- Poliak, S., & Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*, *4*(12), 968-980. doi:10.1038/nrn1253
- Pröbstl, N. (2018). Die Expression von CD44 in murinen Multiple Sklerose Tiermodellen
- Rasband, M. N., Peles, E., Trimmer, J. S., Levinson, S. R., Lux, S. E., & Shrager, P. (1999). Dependence of nodal sodium channel clustering on paranodal axoglial contact in the developing CNS. *J Neurosci*, *19*(17), 7516-7528.
- Ruhling, S., Kramer, F., Schmutz, S., Amor, S., Jiangshan, Z., Schmitz, C., . . . Hochstrasser, T. (2019). Visualization of the Breakdown of the Axonal Transport Machinery: a Comparative Ultrastructural and Immunohistochemical Approach. *Mol Neurobiol*, *56*(6), 3984-3998. doi:10.1007/s12035-018-1353-9
- Saifetiarova, J., Taylor, A. M., & Bhat, M. A. (2017). Early and Late Loss of the Cytoskeletal Scaffolding Protein, Ankyrin G Reveals Its Role in Maturation and Maintenance of Nodes of Ranvier in Myelinated Axons. *J Neurosci*, *37*(10), 2524-2538. doi:10.1523/JNEUROSCI.2661-16.2017
- Sasaki, M., Black, J. A., Lankford, K. L., Tokuno, H. A., Waxman, S. G., & Kocsis, J. D. (2006). Molecular reconstruction of nodes of Ranvier after remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells in the demyelinated spinal cord. *J Neurosci*, *26*(6), 1803-1812. doi:10.1523/JNEUROSCI.3611-05.2006
- Schampel, A., Volovitch, O., Koeniger, T., Scholz, C. J., Jorg, S., Linker, R. A., . . . Kuerten, S. (2017). Nimodipine fosters remyelination in a mouse model of multiple sclerosis and induces microglia-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(16), E3295-E3304. doi:10.1073/pnas.1620052114

- Scheld, M., Fragoulis, A., Nyamoya, S., Zendedel, A., Denecke, B., Krauspe, B., . . . Clarner, T. (2019). Mitochondrial Impairment in Oligodendroglial Cells Induces Cytokine Expression and Signaling. *J Mol Neurosci*, *67*(2), 265-275. doi:10.1007/s12031-018-1236-6
- Schnurbus R., S.-D. A. (2018). Endspurt Klinik Neurologie.
- Segal, B. M. (2003). Experimental autoimmune encephalomyelitis: cytokines, effector T cells, and antigen-presenting cells in a prototypical Th1-mediated autoimmune disease. *Curr Allergy Asthma Rep*, *3*(1), 86-93.
- Sherman, D. L., Tait, S., Melrose, S., Johnson, R., Zonta, B., Court, F. A., . . . Brophy, P. J. (2005). Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron*, *48*(5), 737-742. doi:10.1016/j.neuron.2005.10.019
- Sidman, K., Misra & Senft. . (2017). High Resolution Mouse Brain Atlas <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>
- Stys, P. K., Zamponi, G. W., van Minnen, J., & Geurts, J. J. (2012). Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*, *13*(7), 507-514. doi:10.1038/nrn3275
- Sumaya, C. V., Myers, L. W., Ellison, G. W., & Ench, Y. (1985). Increased prevalence and titer of Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol*, *17*(4), 371-377. doi:10.1002/ana.410170412
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., . . . Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*, *17*(2), 162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci*, *5*(2), 97-107. doi:10.1038/nrn1327
- Wilson, P. J. S. P. (1991). *Progress in Sensory Physiology 11*: Springer-Verlag.
- Zhou, D., Lambert, S., Malen, P. L., Carpenter, S., Boland, L. M., & Bennett, V. (1998). AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol*, *143*(5), 1295-1304.

X. ANHANG

1. Transkardiale Perfusion und Paraffineinbettung

Perfusionslösung (3,7% Formaldehydlösung) für 1 Liter:

Substanz	Menge
Formaldehyde (37%)	100 ml
Aqua destillata	900 ml
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	4,6 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) (anhydrisch)	8,0 g
Natronlauge (NaOH)	nach Bedarf

Den Tieren wurde zur tiefen Narkose ein Ketamin-Xylazin Gemisch intraperitoneal verabreicht. Es erfolgte die transkardiale Perfusion (in den linken Ventrikel) mit 20ml PBS(1X)-Lösung zur Entfernung des im Kreislauf verbliebenen Blutes. Das Gewebe wurde mit 100ml der 3,7% Formaldehydlösung fixiert. Das Gewebe wurde präpariert. Es wurden die inneren Organe und die Haut entfernt. Der Kopf wurde vom restlichen Körper abgetrennt. Die Schädelkalotte wurde eröffnet. Das Gehirn wurde zusammen mit der Schädelkalotte in die Perfusionslösung gelegt. Das Gewebe wurde stets feucht und kühl (bei 4°C) gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde das Gehirn mit einer stumpfen Pinzette vom Knochen gelöst und freigelegt.

PBS-Lösung für 5 Liter:

Substanz	Zusammensetzung
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (10X)-Stocklösung	- 477.75g PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (L182-50 Biochrom) - 5l destilliertes Wasser
PBS (1X)-Fertiglösung	- 500 ml PBS (10x Stocklösung) - 4500 ml destilliertes Wasser - pH auf 7.4 einstellen

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Bulbi vom Gehirn getrennt, sodass eine plane Schnittfläche entstand. Diese diente später als Anschnittfläche des Paraffinblocks. Das Gehirn wurde mit der planen Seite nach unten in die Kassette gelegt.

Da das im Gewebe enthaltene Wasser die Bindung mit Paraffin erschwert, wurde das Gewebe in Alkoholbädern unterschiedlicher Konzentration dehydriert.

Zeitlicher Ablauf der Paraffineinbettung (manuell und automatisch):

Arbeitsschritt	Tag	Dauer
Leitungswasser, fließend	2	5h
50% Ethanol	2-3	über Nacht
70% Ethanol-1	3	40 min
70% Ethanol-2	3	40 min
96% Ethanol-1	3	40 min
96% Ethanol-2	3	40 min
96% Ethanol-3	3	40 min
100% Ethanol-1	3	40 min
100% Ethanol-2	3	60 min
100% Ethanol-3	3	60 min
Xylol-1	3	40 min
Xylol-2	3	40 min
Xylol-3	3	40 min
Paraffin-1	3	60 min
Paraffin-2	3	60 min
Paraffin-3	3-6	mind. 48h

Chemikalien für die Einbettung in Paraffin:

Ethanol	je nach Anzahl der Präparate
Xylol	
Paraffin	

Zur weiteren histologischen Aufbereitung des Gewebes, wurde der Paraffinblock mit Hilfe des Schlittenmikrotoms zu 5µm dünnen Schnitten verarbeitet. Das Wasser-Streckbad mit 48,5°C warmen Aqua destillata gefüllt. Der Gehirnschnitt wurde aus dem Wasserbad auf den Objektträger Superfrost® Plus Micro Slide (VWR GmbH, Deutschland) überführt. Es wurde die Region R215 bis einschließlich R325 entsprechend dem engl. „Mouse Brain Atlas by Sidman et al.“ verwendet. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur auf dem Trockenständer und anschließend über Nacht im Trockenschrank bei 48°C getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung und Färbung der Schnitte wurden diese in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur gelagert.

2. Transkardiale Perfusion und Kryokonservierung

Die Zubereitung und Verabreichung der Perfusionslösung sind unter **Anhang 1** zu finden. Abweichend davon ist der Ablauf der Perfusion, Präparation und Einbettung. Für die IF-Färbungen wurde die Methode der Kryokonservierung gewählt.

Den Tieren wurde zur tiefen Narkose ein Ketamin-Xylazin Gemisch intraperitoneal verabreicht. Es folgte die transkardiale Perfusion mit 20ml 0,9% NaCl und 100ml 3,7% Formaldehydlösung. Für die Spülung mit 0,9% NaCl wurde ein Infusionsset verwendet. Es diente der vollständigen Elimination der erythrozytären Bestandteile aus dem Blutkreislauf, um falsch-positive Reaktionen des Antikörpers AnkyrinG zu vermeiden. Das Gehirn wurde von der Schädelkalotte gelöst und direkt in 10%-Saccharose (Merck, Deutschland) gelegt. Die Postfixation über Nacht wurde nicht durchgeführt. Nach 12 Stunden erfolgte der Austausch von 10%- in 30%-Saccharose und wurde nach 24 Stunden nochmals erneuert. Für jedes Präparat wurde je 1 Falcon Tube verwendet und befanden sich während des gesamten Ablaufs bei 4°C.

Ansatz der Saccharose Lösung (50 ml je Präparat und Stufe):

Saccharose-Stufe	Menge
10% Saccharose	- 5g Saccharose - in 50ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (1X)
30% Saccharose	- 15g Saccharose - in 50ml PBS(1X)

Zeitlicher Ablauf der Saccharose-Reihe:

Lösung	Tag	Dauer
10% Saccharose in Phosphatgepuffertes Salzlösung (PBS) (1X) bei 4°C	1-2	12h (nachts)
30% Saccharose in PBS (1X) bei 4°C	2-3	24h
30% Saccharose in PBS (1X) bei 4°C	3-4	24h

Für die Gefriereinbettung wurde das Gewebe in mit TissueTek O.C.T. (Finetek GmbH, Deutschland) gefüllte Schälchen überführt und in -70°C kaltem Isopentan (VWR GmbH, Deutschland) eingefroren. Alle fertigen Proben wurden im Gefrierschrank bei -20°C in Papp-Boxen gelagert.

Es wurden 20µm dicke Schnitte aus den Regionen 215 und 265 angefertigt. Es wurde das Kryo-Mikrotom CM1950 (Leica Biosystems, Deutschland) verwendet. Die optimale Temperatur des Kryostatinnenraum und Feststellblockes lag bei -21°C. Der einzelne Gehirnschnitt wurde in gekühltem (2°C) PBS(1X) vom umgebenden TissueTek gelöst und von dort auf den Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und direkt in die Färbung überführt.

Chemikalien für die transkardiale Perfusion:

Substanz	Menge je Präparat
0,9% NaCl-Isotone Kochsalzlösung	- 20 ml
Perfusionslösung	- 2x 50 ml (siehe Anhang 1)

Materialien für die Gefriereinbettung:

Trockeneis	Je nach Anzahl der Präparate
TissueTek O.C.T. Compound	
Isopentan	

XI. DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Markus Kipp. Ich danke Ihn für seine überaus freundliche Betreuung und seinen ausgezeichneten akademischen Rat während der Durchführung meiner Versuche. Sein fortwährendes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine stete Bereitschaft zur Diskussion meiner Ideen haben wesentlich zu meinem wissenschaftlichen Fortkommen beigetragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christoph Schmitz dafür, dass ich meine Promotion an seinem Lehrstuhl durchführen durfte.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München, insbesondere Astrid Baltruschat, Beate Aschauer, Sarah Wübbel, Dr. Tanja Hochstrasser und Sabine Tost, für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei all meinen experimentellen Arbeiten und das äußerst angenehme Arbeitsklima.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Luis Stadler, Patrizia Leopold und Nicolas Pröbstl für die unermüdliche Hilfe und Diskussionsbereitschaft beim Abfassen meiner Arbeit bedanken.

Meinen Eltern gebührt ebenfalls meine größte Dankbarkeit. Sie waren mir stets durch ihren Rat behilflich und haben mich immer auf meinem Weg unterstützt. Sie haben sehr zum Gelingen meiner Dissertationsarbeit und meines Studiums beigetragen.

XII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ertl, Carolin

Name, Vorname

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

**„Die Expression der neuronalen Gerüstproteine Ankyrin G und Beta-IV Spektrin
in Multiple Sklerose Mausmodellen“**

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

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

München, 01.07.2021

Ort, Datum

Carolin Ertl

Unterschrift Doktorandin