

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

Langfristige Effekte der Demyelinisierung im Cuprizone Modell

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

vorgelegt von
Dr. med. dent. Florian Nepomuk Fegg

aus
Rotthalmünster

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Markus Kipp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Mikael Simons
Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2021

Gewidmet meinen Eltern

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	4
II Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Multiple Sklerose (MS)	8
1.2 Das Cuprizone-Modell	10
1.3 Fragestellung und Hypothese	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien	13
2.2 Herstellung der Puffer, Blockseren und Färbelösungen	16
2.3 Versuchsaufbau	17
2.4 Versuchsdurchführung	18
2.4.1 Versuchstiere.....	18
2.4.2 Cuprizone-Fütterung.....	19
2.4.3 Tierhaltung (ROB-55.2-2532.Vet_02-18-19)	19
2.4.4 Gewebeaufbereitung für die Immunhistologie	19
2.5 Färbungen	21
2.5.1 Entparaffinieren und Rehydrieren.....	21
2.5.2 Dehydrieren und Eindecken	22
2.5.3 Luxol-Fast-Blue-Färbung	23
2.5.4 Immunhistochemie (IHC).....	24
2.6 Auswertung	29
2.6.1 Untersuchte Hirnregionen.....	29
2.6.2 LFB/PAS-Scoring.....	31
2.6.3 Densitometrie.....	31
2.6.4 Zellzählung	32
2.6.5 Rekonstruktion und Analyse der Mikroglia-morphologie.....	32
2.7 Statistik	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Vollständige Remyelinisierung nach toxisch induzierter Demyelinisierung	38
3.2 Anhaltende Mikrogliazellaktivierung nach Remyelinisierung	44

3.3 Persistierende Astrozytose nach Remyelinisierung.....	47
3.4 Fehlende Rekrutierung von T-Zellen nach Cuprizone-Intoxikation.....	49
3.5 Reaktiver Mikroglia-Phänotyp nach Remyelinisierung	50
4 Diskussion	58
4.1 Grenzen von MS-Tiermodellen.....	58
4.2 Histopathologische Beobachtungen.....	60
4.3 Mikrogliamorphologie.....	64
5 Zusammenfassung	67
III Abbildungsverzeichnis.....	68
IV Tabellenverzeichnis	70
V Literaturverzeichnis	71
VI Eidesstattliche Versicherung	80
VII Danksagung	81

II Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CC	Corpus callosum
CD3	cluster of differentiation 3
DAB	Diaminobenzidin
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
IBA1	ionized calcium binding adapter molecule 1
IHC	Immunhistochemie
ICC	laterales Corpus callosum
LFB	Luxol-Fast-Blue
MBP	Myelin-Basisches-Protein
mCC	mediales Corpus callosum
ml	Milliliter
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
MS	Multiple Sklerose
OLIG2	oligodendrocyte transcription factor 2
PAS	Periodicacid-Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	primär-progrediente MS (engl. primary-progressive MS)
pScx	primär somatosensorischer Cortex
RI	Ramification Index
ROI	region of interest
RRMS	schubförmig-remittierende MS (engl. relapsing-remitting MS)
sog.	sogenannt
SPMS	sekundäre-progrediente MS (engl. secondary-progressive MS)
USA	United States of America
vgl.	vergleiche

ZNS	Zentralnervensystem
μl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose (MS)

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Histopathologische Merkmale der MS sind Demyelinisierung und Rekrutierung peripherer Immunzellen. Diese histopathologischen Veränderungen gehen mit Oligodendrozytenapoptose, Astrogliose, Mikrogliose und axonalem Schaden einher (Compston et al. 2008; Kipp et al. 2012).

Bei MS-Patienten können drei unterschiedliche klinische Verlaufsformen der Erkrankung unterschieden werden. Die häufigste Form wird als schubförmig-remittierende MS (RRMS) bezeichnet und betrifft zunächst 85 Prozent der mit MS diagnostizierten Patienten. Während eines Schubes treten bei Patienten rasch neue oder zunehmende neurologische Funktionseinschränkungen auf. Auf diese Schübe - auch Exazerbationen genannt - folgen Perioden partieller oder sogar vollständiger Genesung (Remissionen). Per Definition gibt es kein offensichtliches Fortschreiten der Krankheit zwischen zwei Schüben, was bedeutet, dass der Grad der Behinderung zwischen zwei Anfällen stabil bleibt (Plateauphase).

Auf die RRMS folgt bei vielen Patienten im weiteren Verlauf eine Phase sich allmählich verschlechternder klinischer Symptomatik (sekundär progrediente MS, SPMS). Bei etwa 15 Prozent der MS-Patienten wird initial die primär-progrediente (PPMS) Verlaufsform diagnostiziert. Betroffene zeigen einen kontinuierlich fortschreitenden Krankheitsverlauf mit Zunahme der Beschwerdeintensität ohne akute Schübe (Keegan & Noseworthy 2002; Kipp & Baumgartner 2011).

Das Alter ist ein wichtiger Risikofaktor für das Fortschreiten der MS (Brück et al. 2003; Franklin et al. 2008). Studien haben gezeigt, dass die progrediente Phase ein altersabhängiger Prozess ist, der mit einem Durchschnittsalter von 39 Jahren beginnt. Das Durchschnittsalter, in dem Patienten in das progrediente Stadium eintreten, ist unabhängig vom Krankheitssubtyp (PPMS, SPMS oder RRMS gefolgt von Progression) auffallend ähnlich (Kremenutzky et al. 2006).

Interessanterweise konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass die Schubrate mit der Krankheitsprogression in keinem direkten Zusammenhang steht. Sowohl Patienten mit hoher als auch mit niedriger oder fehlender jährlicher Schubrate (entzündliche Krankheitsaktivität) zeigen ab einer gewissen Schwere neurologischer

Defizite eine vergleichbare Krankheitsprogression (Ausmaß des neuronalen Schadens) in der progredienten Erkrankungsphase (Vukusic et al. 2007).

Schübe können zwar durch immunmodulatorische Therapien medikamentös unterdrückt werden, der langfristige Krankheitsverlauf wird dadurch jedoch kaum beeinflusst (Kappos et al. 2001; Panitch et al. 2004). Eine Erklärung könnte sein, dass entzündliche Zellen bei progressiver MS, für aktuelle Therapeutika unzugänglich, hinter einer intakten Blut-Hirn-Schranke eingeschlossen sind. Eine weitere Erklärung könnte jedoch sein, dass die anhaltende Degeneration nicht nur auf inflammatorischen Prozessen beruht, sondern autoimmun-unabhängige Mechanismen entscheidend zur Entstehung langfristiger Behinderungen beitragen (Miller et al. 2007; Leary et al. 2005). MS kann also als klassische Autoimmunerkrankung (RRMS) angesehen werden, enthält aber gleichzeitig wichtige Elemente neurodegenerativer Erkrankungen (SPMS, PPMS).

Der Verlust von Axonen scheint der wichtigste Einflussfaktor dauerhafter Einschränkungen bei MS Patienten zu sein (Compston et al. 2008) und ist in frühen Krankheitsstadien am stärksten ausgeprägt (Kuhlmann et al. 2002) und mit aktiver Demyelinisierung verbunden (Bitsch et al. 2000). Durch Remyelinisierung kann die axonale Leitfähigkeit wiederhergestellt werden, was als Faktor für die Verbesserung der neurologischen Funktion während der Remission verantwortlich gemacht werden kann (Franklin et al. 2008). Nachdem die Funktionseinschränkungen in der progredienten Phase aber dauerhaft und irreversibel sind, ist es wichtig zu klären was den Übergang in diese Phase bestimmt.

Es stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung um die unterschiedlichen Aspekte der Entzündung, Demyelinisierung, Remyelinisierung und Neurodegeneration im Zentralnervensystem zu untersuchen. Diese helfen die Heterogenität und Komplexität der pathologischen Mechanismen der MS besser verstehen zu können. Bisher deckt jedoch kein einzelnes experimentelles Modell das gesamte Spektrum der klinischen, pathologischen oder immunologischen Merkmale der Krankheit vollständig ab (Lassmann & Bradl 2017) Die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) ist das am häufigsten verwendete Tiermodell um entzündliche und immunologische Aspekte der MS zu untersuchen (Kipp et al. 2017). Ein weiteres Modell zur Untersuchung der Demyelinisierung und der damit verbundenen pathologischen Veränderungen bei MS ist das Cuprizone-Modell (Gudi

et al. 2014; Kipp et al. 2009; Praet et al. 2014). Zwischen dem EAE- und dem Cuprizone-Modell bestehen mehrere wichtige Unterschiede. Vielleicht am wichtigsten ist, dass T-Zellen für die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung funktionell keine Bedeutung haben.

Damit ist das Cuprizone-Modell geeignet um Vorgänge, die nicht primär durch Entzündungserscheinungen gekennzeichnet sind, zu untersuchen.

1.2 Das Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches Tiermodell zur Untersuchung von De- und Remyelinisierungsprozessen ohne T-Zell-Beteiligung bei weitestgehend intakter Blut-Hirn-Schranke (Bakker & Ludwin, 1987).

Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydraton) ist ein selektiver und empfindlicher Kupferchelatformer. Kurz nach seiner Entdeckung wurde diese Verbindung zum Nachweis von Serumkupfer verwendet. William W. Carlton war einer der ersten, der systematisch pathologische Veränderungen bei Nagetieren nach Cuprizone-Fütterung untersuchte. Neben der Demyelinisierung im ZNS beschrieb er auch Begleitreaktionen wie Ödembildung, Hydrozephalus und Leberläsionen (Carlton 1967; Suzuki et al. 1969). Basierend auf seinen Erkenntnissen verwenden viele Laboratorien heute 6-9 Wochen alte Mäuse und füttern sie mit 0,2 - 0,3% Cuprizone-haltigem Normalfutter. Um eine ordnungsgemäße Demyelinisierung sicherzustellen, sollte die Cuprizonekonzentration bei der Fütterung gealterter Tiere erhöht werden (Norkute et al. 2009). Darüber hinaus wurde über eine stammabhängige Empfindlichkeit gegenüber Cuprizone berichtet. Beispielsweise gibt es einen Unterschied in der Lokalisation und Intensität demyelinisierter Herde zwischen SJL- und C57BL/6-Mäusen. Bei SJL-Mäusen führt die Cuprizone-Intoxikation zu einer stärkeren Demyelinisierung unmittelbar seitlich der Mittellinie des Corpus callosum (Taylor et al. 2009). Die 5-6 wöchige Cuprizone-Intoxikation von Mäusen des Stammes C57BL/6 führt dagegen nachweislich zu einer vollständigen Demyelinisierung des medialen Corpus callosum in bestimmten Gehirnregionen (Hiremath et al. 1998).

Mittels Cuprizone kann bemerkenswerterweise die Demyelinisierung verschiedener Gehirnstrukturen induziert werden. So kommt es zu Läsionen im Hippocampus (Norkute et al. 2009), im Kleinhirn (Groebe et al. 2009), im Corpus callosum (Acs et al. 2009) und im Bereich der Basalganglien (Pott et al. 2009). Zudem sind auch

unterschiedliche Subregionen der grauen Substanz im Kortex (Skripuletz et al. 2008), im Hippokampus und im Striatum betroffen.

Die genaue Wirkungsweise der Cuprizone-Intoxikation ist bis dato noch nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass die Kupfer-bindende Wirkung von Cuprizone mitochondriale Enzyme der Atmungskette hemmt, die Kupfer als Co-Faktor benötigen. Die Folge ist oxidativer Stress (Draheim et al. 2016), der durch den gestörten Energiestoffwechsel bei Oligodendrozyten zur Apoptose führt. Die ersten Anzeichen einer Oligodendrozyten-Apoptose sind bereits zwei Tage nach Beginn der Cuprizone-Gabe erkennbar, parallel zu einer massiven Reduktion der Oligodendrozyten-spezifischen mRNA-Spezies (Buschmann et al. 2012). Die erhöhte Anfälligkeit von Oligodendrozyten wird mit der Myelinsynthese in Verbindung gebracht, die große Mengen an Energie erfordert.

Neben der Oligodendrozyten-Apoptose führt die Cuprizone-Intoxikation auf zellulärer Ebene zur Mikrogliazellaktivierung und Astrozytose (Hiremath et al. 1998; Norkute et al. 2009; Buschmann et al. 2012). Eine nahezu vollständige Demyelinisierung wird nach 5-6 Wochen Cuprizone-Intoxikation erreicht. Das Absetzen von Cuprizone und die anschließende Gabe von normalem Haltungsfutter führen zur spontanen endogenen Remyelinisierung. Im Gegensatz dazu verzögert sich die Remyelinisierung, wenn die Verabreichung von Cuprizone verlängert wird (12–13 Wochen oder länger). Man spricht in diesem Fall von einer chronischen Demyelinisierung (Kipp et al. 2009; Zendedel et al. 2013).

Remyelinisierungsvorgänge lassen sich durch die Myelinscheiden-Färbung mit Luxol-Fast-Blue (LFB) und immunhistochemisch durch die Expression der Myelinproteine 2,3-zyklische Nukleotid-3-Phosphodiesterase (CNPase) und Myelin-Basisches-Protein (MBP) sowie des Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG), und des Proteolipid- Protein (PLP) nachweisen (Lindner et al. 2008).

1.3 Fragestellung und Hypothese

Die MS gilt als die häufigste neurologische Erkrankung unter jungen Erwachsenen in der westlichen Welt. Trotzdem konnten die Krankheitsursachen und ihre Entstehung bis heute nicht ausreichend geklärt werden (Keegan & Noseworthy 2002; Lassmann et al. 2001). Um die neurodegenerativen Aspekte der Krankheit besser verstehen zu

können, kommen in der MS Forschung toxische Tiermodelle (z.B. Cuprizone-Modell) zum Einsatz.

Vorangegangene Studien lassen vermuten, dass nach abgeschlossener Remyelinisierung die axonale Degeneration auf niedrigem Niveau weiter fortschreitet und bei Überschreiten einer gewissen Schwelle langfristig funktionell sichtbar wird (Manrique-Hoyos et al. 2012).

Ziel dieser Arbeit ist es, die langfristigen Auswirkungen einer einmaligen durch Cuprizone hervorgerufenen Läsion (Demyelinisierung) auf etwaige spätere histopathologische Veränderungen im Gehirn zu untersuchen. Unsere Hypothese ist, dass ein einmaliger intrinsischer Schaden – unabhängig von wiederkehrenden Entzündungen – zu langfristigen (zellulären) Veränderungen/Schäden im Gehirn führt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

Material/Chemikalien	Beschreibung	Firma	Bestellnr.
B.Braun Omnifix Luer	Spritze 20ml	Braun; Mainz, Deutschland	4616200F
B.Braun Omnifix Luer	Spritze 50ml	Braun; Mainz, Deutschland	22050
Becherglas	1000ml	VWR; Darmstadt, Deutschland	213-1111
Bienenwachs	gelb: rein natürlich	Roth; Karlsruhe, Deutschland	5830.1
Chloralhydrat	$C_2H_3Cl_3O_2$, $\geq 99,5\%$, Ph.Eur., BP, USP, Trichloroacetaldehydhydrat	Roth; Karlsruhe, Deutschland	K318.1
Dinatriumhydrogen-phosphat	Na_2HPO_4	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.06580.1000
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fluka, Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland	03685
Einbettautomat	Einbettautomat Leica ASP200 S	Leica Biosystems; Wetzlar/Deutschland	ASP200 S
MegaCassette	Einbettkassetten, weiß	Bio Optica; Mailand, Italien	07-7300
Ethanol	EtOH	Merck; Darmstadt, Deutschland	100983
Falcon-Röhrchen	Rotilabo-Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit Beschriftungsfeld; 50 ml	Roth; Karlsruhe, Deutschland	N463.1
Filterpapier	$\varnothing 240\text{mm}$	Schleicher & Schuell; Düren, Deutschland	594 1/2
Formaldehyd	37%	Roth; Karlsruhe, Deutschland	CP10.2
Nadeln	27Gx 3/4; 0,4x20mm	Terumo; Eschborn, Deutschland	NN-2719R
Natriumdihydrogen-phosphat	NaH_2PO_4	Merck; Darmstadt, Deutschland	1063461000
Natronlauge	NaOH 1 mol/l	Roth; Karlsruhe, Deutschland	K021.1
Objekträger	SuperFrost Plus	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-0108
OP-Besteck	Schere, Pinzetten, Stecknadeln		
Paraffin		Merck; Darmstadt, Deutschland	K46815058603
Paraplast		Leica Biosystems; Wetzlar/Deutschland	39602012
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PBS-Pulver ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}	Merck; Darmstadt, Deutschland	L-182-50
Safety-Multifly-Kanüle	20G 200mm lang	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland	85.1637.235
Schlittenmikrotom 1 und 2	Leica SM2000R	Leica Biosystems; Wetzlar, Deutschland	Kat.Nr. 045333784
Schlittenmikrotom 3	Leica SM2010R	Leica Biosystems; Wetzlar, Deutschland	Kat.Nr. 050842258

Material und Methoden

Schottflaschen	1000ml, Enghalsflasche mit Schraubverschluss	VWR; Darmstadt, Deutschland	215-1557
Schottflaschen	2000ml Enghalsflasche mit Schraubverschluss	VWR; Darmstadt, Deutschland	215-1558
Spritze	1ml	Henke-Sass Wolf GmbH; Tuttlingen, Deutschland	
Trichter	Ø250mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	221-1730
Wasserbad	Leica HI1210	Leica Biosystems; Wetzlar/Deutschland	Kat.Nr. 14041521466
Xylol	isomerisch. Analar Normapur ACS, ISO	VWR; Darmstadt, Deutschland	28975.462

Tabelle 1: Materialien/Chemikalien für Perfusion, Einbettung und Schnittherstellung

Material/Chemikalien	Beschreibung	Firma	Bestellnr.
ABC-Kit	Avidin/Biotin Komplex	Vector; Burlingame, USA	PK-6100
Aluminiumkaliumsulfat Dodecahydrat	$KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$	Merck; Darmstadt, Deutschland	15935
Anti-CD3, Rabbit	Primärantikörper gegen CD3	Abcam; Cambridge, UK	ab16669
Anti-Chicken IgG	Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Huhn	Vector; Burlingame, USA	BA9010
Anti-GFAP, Chicken	Primärantikörper gegen GFAP	Abcam; Cambridge, UK	ab4674
Anti-IBA1, Rabbit	Primärantikörper gegen IBA1	Wako; Osaka, Japan	019-19741
Anti-Mouse IgG	Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Maus	Vector; Burlingame, USA	BA9200
Anti-Olig2, Rabbit	Primärantikörper gegen Olig2	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland	AB9610
Anti-PLP, Mouse	Primärantikörper gegen PLP	Bio-Rad; Kidlington, UK	MCA838G
Anti-Rabbit IgG	Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Hase	Vector; Burlingame, USA	BA1000
Chloralhydrat	$C_2H_3Cl_3O_2$	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland	15307
DAB-Substrat	Diaminobenzidin	Dako; Carpinteria, USA	K3468
DAB-Stock	Diaminobenzidin	Dako; Carpinteria, USA	K3468
Deckgläser 50 mm	24x50 mm	VWR; Darmstadt, Deutschland	631-1574
DPX	DePeX	Serva; Heidelberg, Deutschland	18243.02
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat - Puffer	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland	03609
EnVision®	EnVision+System-HRP/rabbit	Dako; Carpinteria, USA	K4003
Eppendorf Pipette 1	0,5-10 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	
Eppendorf Pipette 2	10-100 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	

Material und Methoden

Eppendorf Pipette 3	100-1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	
Eppendorf Spitzen (Tips) 1	0,1-20µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030000.838
Eppendorf Spitzen (Tips) 2	2-200µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030000.870
Eppendorf Spitzen (Tips) 3	50-1000µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030000.919
Eppendorf Tubes 1	1,5 ml	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030120.086
Eppendorf Tubes 2	2,0 ml	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030120.094
Eppendorf Tubes 3	5,0 ml	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	0030119.401
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	Merck; Darmstadt, Deutschland	1000631000
Ethanol	EtOH	Merck; Darmstadt, Deutschland	100983
Hämatoxylin	C ₁₆ H ₁₄ O ₆ ·xH ₂ O	Sigma-Aldrich; Steinheim, Deutschland	H3136-25G
HCl	Salzsäure	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.09060.1000
Lithiumcarbonat	Li ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt Deutschland	56710250
Luxol-Fast Blue MBS	LFB	Chroma #M146-F 10g Glas, 25g Glas	1328-51-4
Natriumjodat	NaIO ₃	Merck; Darmstadt, Deutschland	6525
Natronlauge	NaOH	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.09137.1000
Normales Ziegenserum	= normal goat serum	Vector; Burlingame, USA	S-1000
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PBS-Pulver ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Merck; Darmstadt, Deutschland	L-182-50
Perjodsäure	PAS	Merck, Darmstadt Deutschland	524
Schiffs Reagenz	fuchsin-schweflige Säure	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland	3952016
Tris (Pufferan®)	Puffer	Roth; Karlsruhe, Deutschland	AE15.2
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂ 30%	Roth; Karlsruhe, Deutschland	8070.4
Xylol	isomerisch. Analar normapur ACS, ISO	VWR; Darmstadt, Deutschland	28975.462
Zitronensäure Monohydrat	C ₆ H ₈ O ₇	Merck; Darmstadt, Deutschland	1.00244.0500

Tabelle 2: Materialien/Chemikalien für Färbungen (LFB, IHC, Kerngegenfärbung)

2.2 Herstellung der Puffer, Blockseren und Färbelösungen

1. Phosphate Buffered Saline (PBS), 10x Stocklösung:

Eine Dose PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (477,5 g) wurde in 4000 ml Aqua dest. vollständig gelöst und die Lösung auf 5000 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte in einem Kanister bei Raumtemperatur.

2. PBS, 1x Fertiglösung (1:10 verdünnte Stocklösung):

4000 ml Aqua dest. wurden für 20 Minuten mit 500 ml der Stocklösung vermischt und der pH-Wert mit 0,1 molarer HCl-Lösung auf 7,4 eingestellt. Am Ende der Titration wurde die Lösung auf 5000 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte in einem Kanister bei Raumtemperatur.

3. Tris/EDTA-Puffer:

6,05g Tris sowie 1,85g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat wurden in 4000 ml Aqua dest. für 20 Minuten gelöst und der pH-Wert mit 0,1 molarer NaOH-Lösung auf 9,0 eingestellt. Am Ende der Titration wurde die Lösung auf 5000 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte in einem Kanister bei Raumtemperatur.

4. 5% normales Ziegenserum:

2,5 ml 100%iges normales Ziegenserum wurden unter 30 minütigem Rühren mit 47,5 ml 1x PBS-Fertiglösung verdünnt (1:20). Die Lagerung erfolgte in einzelnen 1 ml Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. 0,3% H_2O_2 :

1 ml H_2O_2 (lichtgeschützt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert) wurde unmittelbar vor der Verwendung mit 99 ml 1x PBS-Fertiglösung 1:100 verdünnt.

6. DAB-Komplex:

Für 1000 μl Lösung in der Verdünnung 1:50 wurden 20 μl DAB Stock und 980 μl DAB Substrat vermischt.

7. Perfusionslösung:

Für einen Liter Lösung wurden 100 ml Formaldehyd (37 %) mit 900 ml Aqua dest. vermischt und darin 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) sowie 8,0 g

Dinatriumphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) gelöst. Mit NaOH wurde der pH-Wert der Perfusionslösung unter konstanter Messung mittels pH-Sonde auf einen Wert von 7,4 titriert.

8. Luxol-Fast-Blue-Färbelösung:

Für eine 0,1%ige Luxol-Fast-Blue-Lösung wurden 0,1 g Luxol-Fast-Blue MBS in 100 ml 96% Ethanol gelöst und 0,5 ml 100% Essigsäure zugesetzt.

9. Hämatoxylin-Lösung:

1g Hämatoxylin wurde in 1000 ml Aqua dest. gelöst. In dieser Lösung wurden 200 mg Natriumjodat und 50 g Aluminiumkaliumsulfat-dodecahydrat durch Schütteln zu einer blauen Flüssigkeit gelöst. Um einen Farbumschlag ins Rot-Violette zu erzeugen wurden 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure Monohydrat hinzugefügt.

2.3 Versuchsaufbau

Ziel der Arbeit war es, die langfristigen Auswirkungen einer einmaligen durch Cuprizone hervorgerufenen Läsion (Demyelinisierung) auf etwaige spätere histopathologische Veränderungen im Gehirn zu untersuchen.

Paraffinschnitte aus den Regionen 160, 215 und 265 – entsprechend dem High Resolution Mouse Brain Atlas (Sidman et al.) – wurden systematisch für jedes Versuchstier Luxol-Fast-Blue-/Periodic-acid-Schiff (LFB/PAS) sowie immunhistochemisch mit Antikörpern gegen IBA1 (engl. ionized calcium binding adapter molecule 1), GFAP (engl. glial fibrillary acidic protein), OLIG2 (engl. oligodendrocyte transcription factor 2), PLP (Proteolipid Protein) und CD3 (cluster of differentiation 3) gefärbt. Anschließend wurde eine Quantifizierung mittels Densitometrie oder Auszählung dieser Färbungen im medialen (mCC) und lateralen Corpus callosum (ICC) durchgeführt. Um Veränderungen auf morphologischer Ebene zu untersuchen wurden im Bereich der Region 265 Mikrogliazellen von Tieren der Kontroll- und Cuprizone-Gruppe mittels 3D-Rekonstruktion analysiert.

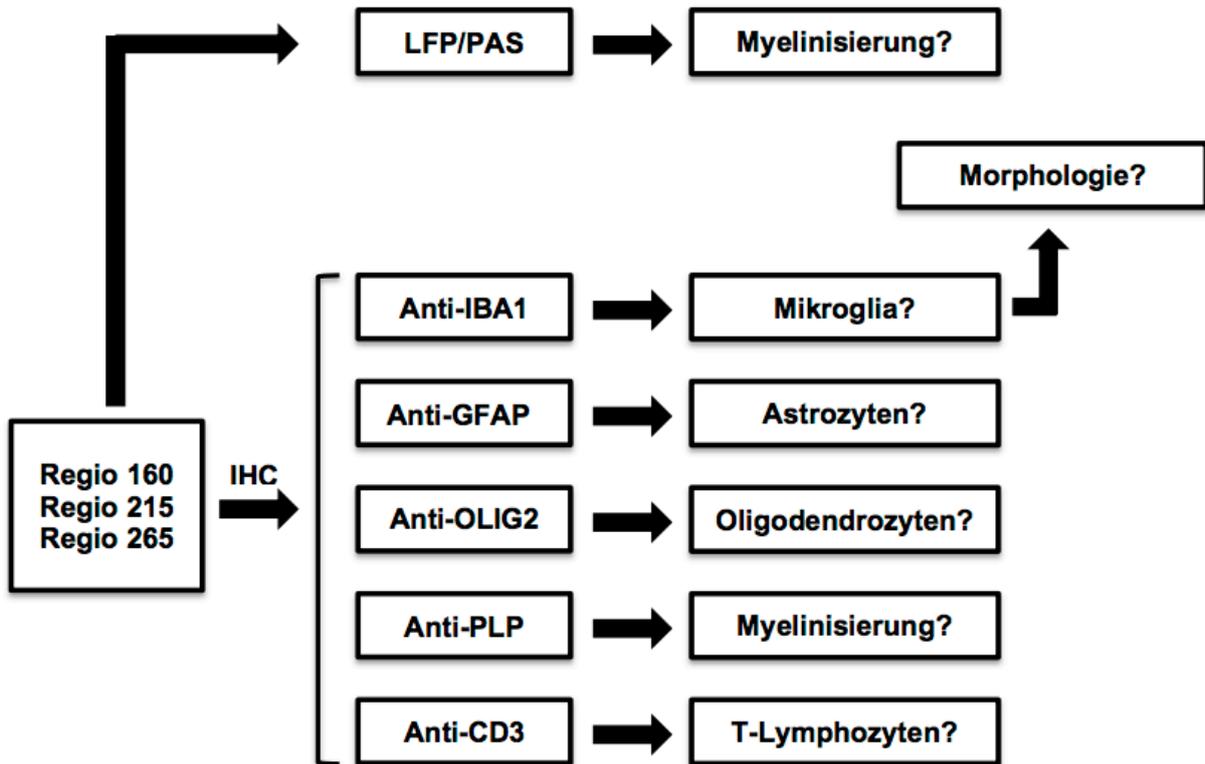
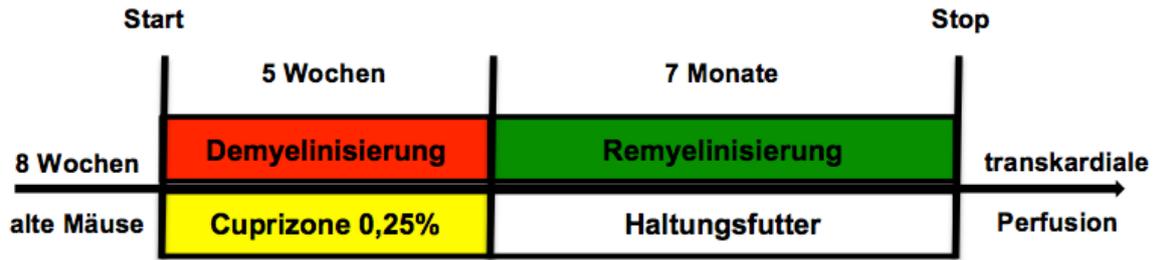


Abbildung 1: Versuchsaufbau

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Versuchstiere

Im Rahmen der Experimente wurden 8 Wochen alte männliche Mäuse vom Stamm C57BL/6J (Janvier/Frankreich) mit einem Gewicht bei Versuchsbeginn von durchschnittlich 20 g verwendet. Die Tiere wurden zufällig auf die Cuprizone-Gruppe (n=5) und die Kontrollgruppe (n=5) verteilt und unmittelbar vor Versuchsbeginn mit einer Ohrmarkierung versehen.

2.4.2 Cuprizone-Fütterung

Die Versuchstiere wurden für 5 Wochen mit 0,25% Cuprizone-haltigem Futter gefüttert. Dazu wurden 200 g gemahlene Standardfutter und 0,5 g Cuprizone mit einem Rührgerät für eine Minute vermischt und in Futterschalen im Käfig gefüllt. Pro Maus wurden pro Tag 20 g Futter verfüttert. Aufgrund der physikalischen Instabilität von Cuprizone als Kupferchelator erfolgte die Futterzubereitung täglich frisch unmittelbar vor der Fütterung. Die Kontrollgruppe erhielt normales Haltungsfutter in gleicher Menge. Im Anschluss an die 5-wöchige Cuprizone-Gabe wurden beide Gruppen bis zur Beendigung des Versuchs für weitere 7 Monate mit Normalfutter gefüttert.

2.4.3 Tierhaltung (ROB-55.2-2532.Vet_02-18-19)

Die Haltung der Tiere erfolgte nach standardisierten Laborbedingungen gemäß der Organisation „Federation of European Laboratory Animal Science Association's (felasa)“ in gut belüfteten Käfigen. Die Tiere wurden bei einem festgelegten Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden, einer standardisierten Raumtemperatur von $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und einer standardisierten Luftfeuchtigkeit von $55\% \pm 10\%$ gehalten. Die Käfige (Firma: Tecniplast) waren standardmäßig mit Trinkflasche, Labortiereinstreu (Firma: Abedd), Nestlets (Firma: Zoonlab) und Häuschen ausgestattet. Nagerfutter und Trinkwasser waren zu jeder Zeit uneingeschränkt zugänglich.

2.4.4 Gewebeaufbereitung für die Immunhistologie

2.4.4.1 Perfusion und Präparation

Zur Fixation der Gehirne wurden die Versuchstiere am Versuchsende tierschutzkonform getötet und transkardial perfundiert. Dazu wurde frische Perfusionslösung angesetzt. Die anschließende Lagerung erfolgte in einer Glasflasche auf Eis.

Zu Beginn der Perfusion wurde durch die intraperitoneale Injektion eines Narkotikums der irreversible Hirntod herbeigeführt. Nach Feststellung des Hirntods durch Erlöschen der Hirnstammreflexe wurden die Mäuse mit dem Rücken auf eine Wachsplatte gelegt und mit Nadeln fixiert. Mit einer Schere wurde die Bauchhaut bis zum Hals entfernt und Abdomen sowie Thorax eröffnet. Nach Freilegung des Herzens wurde der rechte Vorhof zur Schaffung eines Abflusses eröffnet und eine

Material und Methoden

Kanüle über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt. Über diese erfolgte die transkardiale Perfusion der Versuchstiere mit zunächst jeweils 20 ml eisgekühlter PBS-Lösung gefolgt von zwei mal 50 ml Perfusionslösung.

Nach der Perfusion wurde der Kopf abgetrennt und der Schädel so vorpräpariert, dass das Gehirn frei lag. Dann erfolgte über Nacht die Postfixation in jeweils 50 ml Perfusionslösung in einem Falcon Tube bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde das Gehirn nach vollständiger Eröffnung der Kalotte mit einer stumpfen Sonde aus dem noch umgebenden Schädel gelöst und in PBS zwischengelagert.

2.4.4.2 Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung ist eine Möglichkeit um histologische Schnitte aus Geweben herzustellen. Dazu wurden die Mäusehirne aus dem PBS entnommen und in jeweils einer Einbettkassette (MegaCassette; Bio Optica 07-7300) unter fließendem Leitungswasser für ca. 5 Stunden gespült. Anschließend wurden die Präparate durch die aufsteigende Alkoholreihe von Ethanol (50%, 70%, 96%, 100%) (CLN; 1006.9025) über Xylol (VWR International; 28975.462) in Paraffin (VWR; 107158.9025) gebracht (siehe Tabelle 3).

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Ethanol 50 %	über Nacht
2	Ethanol 70%	40 min
3	Ethanol 70 %	40 min
4	Ethanol 96 %	40 min
5	Ethanol 96%	40 min
6	Ethanol 100 %	40 min
7	Ethanol 100 %	60 min
8	Ethanol 100 %	60 min
9	Xylol	40 min
10	Xylol	40 min
11	Xylol	40 min
12	Paraffin	60 min

Material und Methoden

13	Paraffin	60 min
14	Paraffin	mind. 48 Stunden

Tabelle 3: Paraffineinbettung

Die Arbeitsschritte erfolgten abgesehen von der Einbettung in Paraffin jeweils auf einem Horizontalschüttler. Aus dem letzten Paraffin wurden die Gehirne am Ende ausgebettet und in eine neue Einbettkassette gegeben. Diese wurde mit flüssigem Paraffin aufgefüllt und bis zur Aushärtung auf einer Kälteplatte gelagert. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.4.4.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Zum Färben und zur anschließenden lichtmikroskopischen Untersuchung der eingebetteten Gewebeschnitte mussten diese von der Paraffin-Blockform in dünne Schnitte überführt werden. Dazu wurden die Blöcke mittels zweier Stellschrauben mit der Oberfläche parallel zur Klinge in ein Schlittenmikrotom (Leica Biosystems; SM2000R) eingespannt und in dieser Position fixiert. An einem Drehregler wurde die gewünschte Schnittdicke von 5 µm eingestellt und die Klinge so lange über den Block geführt, bis die Oberfläche mit einer Bewegung komplett erfasst werden konnte. Ab diesem Zeitpunkt wurden die vollständigen Schnitte mittels Seidenpapier in ein 48 °C warmes Wasserbad (Leica Biosystems; HI1210) überführt und von dort auf Objektträger (SuperFrost® Plus; VWR International; 631-0108) aufgezogen. Auf einen Objektträger wurden immer zwei Schnitte aufgenommen. Nach dem Abtropfen wurden die fertigen Objektträger zunächst für 3-4 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend bei 48 °C über Nacht im Wärmeschrank getrocknet.

2.5 Färbungen

2.5.1 Entparaffinieren und Rehydrieren

Zum Anfärben der Schnitte müssen diese aus dem Paraffin gelöst werden und in eine wässrige Lösung überführt werden, da die meisten Färbelösungen im wässrigen Medium gelöst sind.

Die Objektträger wurden dafür nach dem immer gleichen Protokoll (siehe Tabelle 4) durch eine absteigende Alkoholreihe aus Xylol (VWR International; 28975.462) und Ethanol (CLN; 1006.9025) geführt.

Material und Methoden

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Xylol	5 min
4	Xylol/Ethanol (1:1)	5 min
5	Ethanol 100 %	3 min
6	Ethanol 100 %	3 min
7	Ethanol 96 %	3 min
8	Ethanol 96 %	3 min
9	Ethanol 70 %	3 min
10	Ethanol 50 %	3 min
11	Aqua dest.	3 min

Tabelle 4: Absteigende Alkoholreihe

2.5.2 Dehydrieren und Eindecken

Am Ende der Färbung muss den Präparaten zur dauerhaften Konservierung das Wasser wiederum entzogen werden. Hierfür wird die absteigende Alkoholreihe in einer separaten Reihe in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen (siehe Tabelle 5).

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Aqua dest.	3 min
2	Ethanol 50 %	3 min
3	Ethanol 70 %	3 min
4	Ethanol 96 %	3 min
5	Ethanol 96 %	3 min
6	Ethanol 100 %	3 min
7	Ethanol 100 %	3 min
8	Xylol/Ethanol (1:1)	5 min
9	Xylol	5 min
10	Xylol	5 min
11	Xylol	5 min

Tabelle 5: Aufsteigende Alkoholreihe

Vom Xylol aus erfolgte nach dem Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit das Eindecken der Objektträger. Dazu wurden Deckgläser (VWR; 631-1574) mittels DPX (Serva Electrophoresis GmbH; DePeX; 001824301) blasenfrei auf die Schnitte aufgebracht. Für ein möglichst optimales Ergebnis wurden die Objektträger nach 15 Minuten mit Gewichten beschwert und über Nacht ausgehärtet. Überschüsse von DPX wurden am nächsten Tag mit einer Skalpellklinge entfernt.

2.5.3 Luxol-Fast-Blue-Färbung

Die Markscheidenfärbung mittels Luxol-Fast-Blue (LFB) ermöglicht die Beurteilung der Myelinisierung von Nervengewebe unter dem Lichtmikroskop. Zu Beginn wurden die Schnitte zum Entparaffinieren (vgl. Tabelle 4) bis zum 96%igen Ethanol durch die absteigende Ethanolreihe geführt und im Anschluss in die LFB-Färbelösung gebracht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 56° C im Wärmeschrank. Am nächsten Tag erfolgte die Differenzierung des Farbsignals in Lithiumcarbonatlösung durch schrittweises Herauswaschen der Farbe. Dazu wurde die überschüssige Farbe zunächst in 96%igem Ethanol und in Aqua dest. abgespült und die Schnitte anschließend zum Lösen der Farbkomplexe für 10 Sekunden in 1:5 verdünnte 0,05%ige Lithiumcarbonatlösung (0,5 g Lithiumcarbonat in 1000 ml Aqua dest.) gebracht. Zum Auswaschen der gelösten Komplexe erfolgte für weitere 10 Minuten die Lagerung in 70%igem Ethanol. Danach erfolgte die mikroskopische Kontrolle des Gewebes. War die Hintergrundfärbung noch nicht ausreichend ausgewaschen, wurden die Schnitte bis zur kompletten Differenzierung in einem weiteren Zyklus für 10 Sekunden durch 1:10 verdünntes 0,05%iges Lithiumcarbonat und für 10 Minuten durch 70 % Ethanol geführt. Dieser Schritt wurde wenn nötig mehrmals wiederholt bis sich die graue Substanz unter dem Mikroskop farblos und die weiße Substanz blau/türkis darstellte. Nach Zwischenlagerung in Aqua dest. folgte eine Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS) um kohlenhydrathaltige Gewebestrukturen sichtbar zu machen (Kollagene, Glykoproteine, Basalmembran usw.). Zunächst wurden die Schnitte für 2 Minuten in 0,5%iger Periodsäurelösung oxidiert und in Aqua dest. abgespült. Danach wurden sie für ca. 7 Minuten in Schiffs' Reagenz gestellt bis sie einen leicht pinken Farbton annahmen. Durch nachfolgendes Waschen in lauwarmem Leitungswasser für 5 Minuten schlug der Farbton in ein dunkles pink um. Nach erneutem Spülen in Aqua dest. folgte die Gegenfärbung in Mayer's Hämalaun für 20 Sekunden und weiteren 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Danach

erfolgten das Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe zum Entwässern und das Eindecken in DPX.

2.5.4 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) nach der ABC-Methode ermöglicht den indirekten Nachweis von bestimmten Antigenen in einem Gewebe mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Der Primärantikörper bindet dabei an das gesuchte Protein/Epitop (Antigen) im Gewebe (Abbildung 2 A). Er kann monoklonal oder polyklonal sein. An den Primärantikörper bindet ein gegen diesen gerichteter biotinylierter Sekundärantikörper (Abbildung 2 B). Avidin bindet durch seine Affinität zu Biotin an den biotinmarkierten Sekundärantikörper und es entsteht ein Avidin-Biotin-Komplex (Abbildung 2 C). Dieser enthält das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, engl. horseradish), welches in Kombination mit Wasserstoffperoxid das zur Visualisierung zugegebene Farbsubstrat Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) umsetzt (Abbildung 2 D).

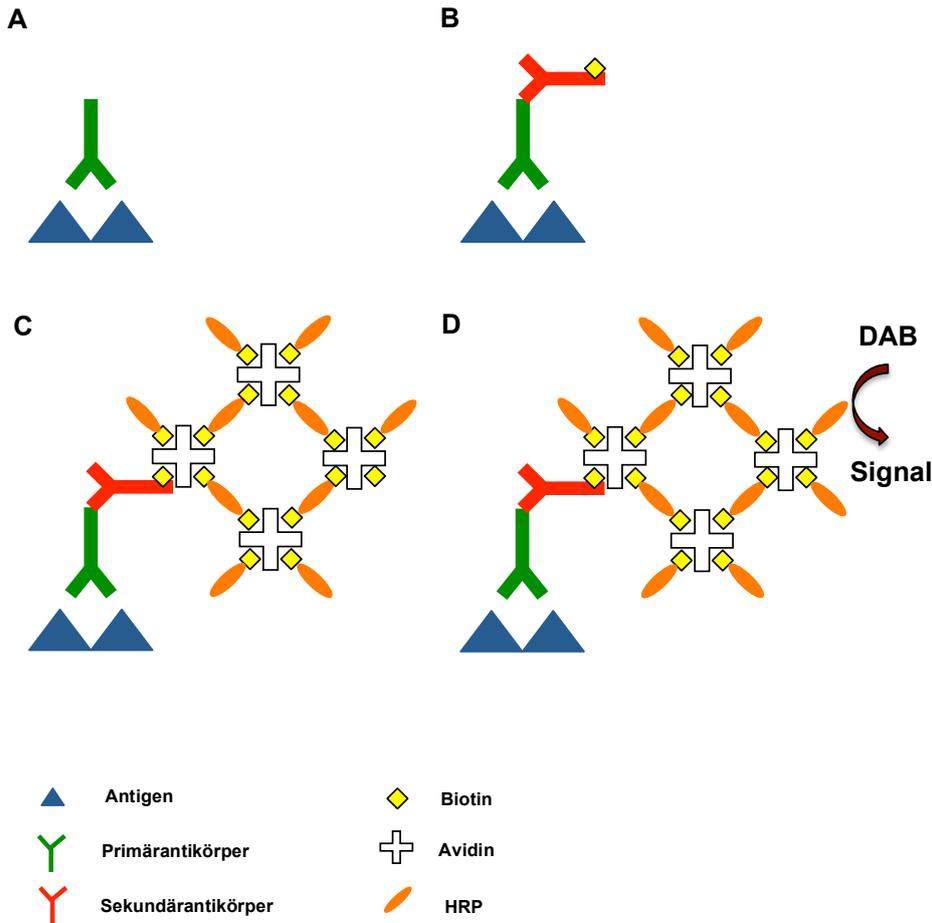


Abbildung 2: IHC nach der ABC-Methode

Zur Gewährleistung vergleichbarer Färbequalitäten erfolgten alle immunhistochemischen Färbungen der jeweiligen Objektträger nach dem gleichen standardisierten Färbeprotokoll (vgl. Tabelle 8).

Als erster Schritt wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Die Formalinfixierung und Einbettung der Proben in Paraffin kann durch Bildung von „crosslinks“ zu Änderungen der Antigenstruktur führen (Maskierung), die bis zum Verlust der Immunreaktivität führen kann. Durch Hitzebehandlung (sog. „heat induced epitope retrieval“ (HIER)) kann die Zugänglichkeit des Antigens jedoch verbessert bzw. wiederhergestellt werden (Demaskierung).

Dazu wurden die Objektträger in Tris/EDTA-Puffer (Tris: Pufferan®; Roth; A-1086 / EDTA: Fluka; 0368) gegeben und in der Mikrowelle zum Sieden gebracht sowie für weitere 10 Minuten gekocht.

Bei Antikörpern, die in der Etablierung das beste Färbeergebnis ohne HIER zeigten wurde der Demaskierungsschritt übersprungen (siehe Tabelle 6).

Material und Methoden

Antikörper	Wirt	Klonalität	Konzentration	HIER
anti-IBA1 IgG	Hase	polyklonal	1:5000	Tris/EDTA
anti-GFAP IgG	Huhn	polyklonal	1:8000	Tris/EDTA
anti-OLIG2 IgG	Hase	polyklonal	1:4000	Tris/EDTA
anti-PLP IgG	Maus	monoklonal	1:5000	keine
anti-CD3 IgG	Hase	monoklonal	1:1000	Tris/EDTA

Tabelle 6: Primärantikörper

Anschließend wurden die Objektträger unter leichter Bewegung auf einem Horizontalschüttler 3 mal für jeweils 5 Minuten in PBS gespült. Danach erfolgte zur Verhinderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung das „Blocking“ mit 5%igem normalen Ziegen Serum in PBS. Dazu wurden pro Objektträger 100 µl des Serums aufgebracht und die Gewebe für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 26°C inkubiert. Nach Abtropfen des Blockingserums wurde der jeweilige Antikörper in entsprechender Verdünnung (vgl. Tabelle 6) zu je 100 µl pro Objektträger appliziert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4° C im Kühlschrank in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag erfolgte zu Beginn erneut ein Spülschritt (3 x 5 Minuten) in PBS, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation in 0,3 % H₂O₂ (lichtgeschützt unter ständiger Bewegung auf dem Schüttler) zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase des Gewebes. Nach einem weiteren Spülschritt (siehe oben) wurde der biotinylierte Sekundärantikörper appliziert (100 µl pro Objektträger) und die Schnitte für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 26 °C im Inkubator gelagert (Tabelle 7). Der Sekundärantikörper ist gegen die Spezies gerichtet aus welcher der Primärantikörper stammt.

Antikörper	Wirt	Konzentration
anti-Hase IgG	Ziege	1:200
anti-Huhn IgG	Ziege	1:200
anti-Maus IgG	Ziege	1:200

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Material und Methoden

Im Anschluss an eine erneute Spülung mit PBS (siehe oben) wurden 100 µl des Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex) (Vectastain Elite-Kit; PK-6100) pro Objektträger aufgetragen. Dieser wurde 30 Minuten vor der Anwendung aus Stock A und Stock B jeweils 1:50 verdünnt angesetzt und dunkel gelagert. Die Inkubation erfolgte wieder für eine Stunde in der feuchten Kammer bei 26 °C.

Nach einem letzten PBS-Spülschritt (siehe oben) wurde die Färbung durch Zugabe von 100 µl 1:50 verdünntem DAB für 10 Minuten pro Objektträger (Dako; K3468) visualisiert. Zum Beenden der Farbreaktion wurden die Schnitte für einige Sekunden in Leitungswasser getaucht und anschließend für 5 Minuten in destilliertem Wasser gelagert. Bei Bedarf wurde zur vereinfachten anatomischen Orientierung noch eine Gegenfärbung der Zellkerne mittels Hämatoxylin-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte für 30 Sekunden in ein Hämalaun-Bad getaucht und danach für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach 3 minütiger Lagerung in destilliertem Wasser wurden die Gewebe in der aufsteigenden Alkoholreihe (vgl. Tabelle 5) dehydriert und mit DPX eingedeckt.

Tag 1
Entparaffinieren und Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe
ggf. Antigen-Demaskierung mittels HIER und Abkühlen auf Raumtemperatur
3 x 5-minütiges Spülen in PBS
Blocking mit 5%igem normalem Ziegen Serum
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 26°C für 1 Stunde
Abtropfen des Blockingserums
Applikation des Primärantikörpers
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht
Tag 2
3 x 5-minütiges Spülen in PBS
Inkubation in 0,3% H ₂ O ₂ für 30 Minuten (lichtgeschützt)
3 x 5-minütiges Spülen in PBS
Applikation des Sekundärantikörpers
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 26°C für 1 Stunde
3 x 5-minütiges Spülen in PBS

Material und Methoden

Applikation des Avidin-Biotin-Komplex
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 26°C für 1 Stunde
3 x 5-minütiges Spülen in PBS
Visualisierung mit DAB
Inkubation für 10 Minuten
Beenden der Färbereaktion in Leitungswasser
Spülen in Aqua dest. für 5 Minuten
ggf. Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin
Rehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und Eindecken mit DPX

Tabelle 8: IHC-Färbeprotokoll nach der ABC-Methode

Die IHC-Färbung zur nachfolgenden Mikroglia-Rekonstruktion erfolgte mit der indirekten zwei Schritt-Methode (siehe Tabelle 9) mit gebrauchsfertigem EnVision® plus Peroxidase (Dako; K4003) zur Visualisierung. Das System basiert auf einem HRP-markierten Polymer, das direkt mit einem sekundären Antikörper konjugiert ist. Das markierte Polymer enthält kein Avidin oder Biotin. Folglich wird eine unspezifische Färbung durch endogene Avidin-Biotin-Aktivität verhindert oder signifikant minimiert. Für die spätere Rekonstruktion störende Hintergrundsignale können so möglichst gering gehalten werden.

Tag 1
Entparaffinieren und Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe
Antigen-Demaskierung mittels HIER (Tris/EDTA) und Abkühlen auf Raumtemperatur
3 x 5-minütiges Spülen in PBS
Blocking mit 5%igem normalem Ziegenserum
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 26 °C für 1 Stunde
Abtropfen des Blockingserums
Applikation des Primärantikörpers
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht

Material und Methoden

Tag 2
3 x 5-minütiges Spülen in PBS
Inkubation in 0,3% H ₂ O ₂ für 30 Minuten (lichtgeschützt)
3 x 5-minütiges Spülen in PBS
Applikation von EnVision® (Sekundärantikörper plus HRP-Komplex)
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 26 °C für 1 Stunde
3 x 5-minütiges Spülen in PBS
Visualisierung mit DAB
Inkubation für 10 Minuten
Beenden der Färbereaktion in Leitungswasser
Spülen in Aqua dest. für 5 Minuten
Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin
Rehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und Eindecken mit DPX

Tabelle 9: IHC-Färbeprotokoll nach der 2-Schritt-Methode

2.6 Auswertung

2.6.1 Untersuchte Hirnregionen

Die Cuprizone-Intoxikation bei Mäusen induziert eine hochgradig reproduzierbare Demyelinisierung bestimmter Hirnregionen, darunter das Corpus callosum (CC), das in diesem Tiermodell die am häufigsten untersuchte Region der weißen Substanz darstellt. In der vorgelegten Arbeit wurden daher zur histopathologischen Auswertung das laterale (ICC) und mediale Corpus callosum (mCC) der Regionen 160, 215 und 265 (nach Sidman et al.) als sog. „region of interest“ (ROI) definiert (Abbildung 3).

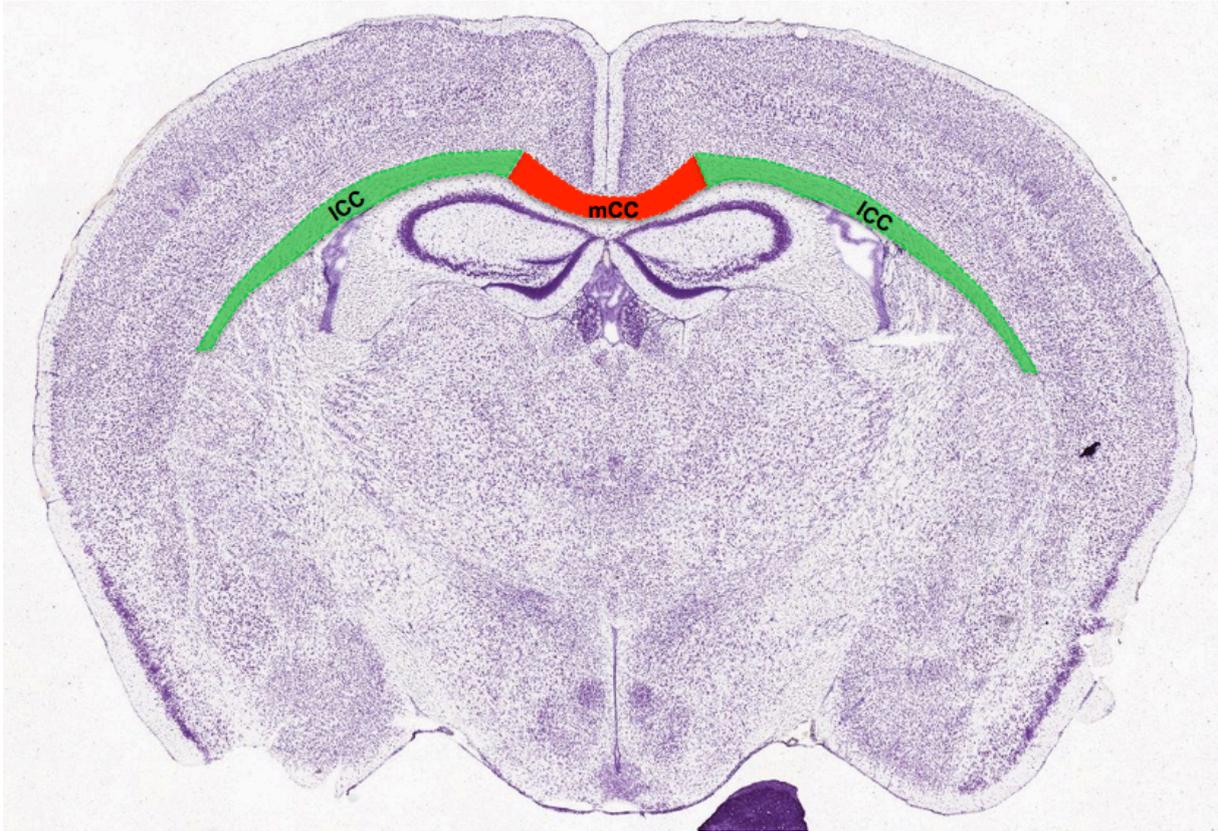


Abbildung 3: Analyzierte Gehirnregionen (Quelle: In Anlehnung an Allen Institut)

Eine weitere umfangreiche Demyelinisierung findet im Cuprizone-Modell im Bereich des Cortex statt. Die Anzahl der Mikrogliazellen ist hier nach Cuprizone-Fütterung signifikant erhöht, wenn auch insgesamt deutlich geringer als im Bereich des CC. Die Verteilung aktivierter Mikroglia ist im gesamten Cortex nicht homogen, sondern während einer 5-wöchigen Cuprizone-Behandlung überwiegend in den Schichten 5 und 6 angrenzend zum CC lokalisiert (Gudi et. al. 2009).

Zur morphologischen Analyse wurden Mikrogliazellen im Bereich der Schichten 5 und 6 des primär somatosensorischen Cortex (pScx) der Region 265 dreidimensional rekonstruiert.

2.6.2 LFB/PAS-Scoring

Bei den LFB/PAS gefärbten Gehirnschnitten erfolgte die Beurteilung der Demyelinisierung des CC verblindet unter dem Mikroskop nach einem standardisierten Score von 0 bis 3 (Hirreath et. al. 1998).

Ein Score von 0 entspricht dabei dem Demyelinisierungsgrad einer unbehandelten Maus (keine Demyelinisierung) während ein Score von 1 einer Demyelinisierung von einem Drittel der Myelinfasern und ein Score von 2 einer Demyelinisierung von zwei Dritteln der Myelinfasern entspricht. Ein Score von 3 entspricht einer vollständigen Demyelinisierung nach ca. 5-wöchiger Cuprizone-Behandlung.

2.6.3 Densitometrie

Vor der Auswertung wurden alle Objektträger gründlich gereinigt und lichtmikroskopische Scans (10x Vergrößerung) der anti-IBA1, anti-GFAP und anti-PLP gefärbten Paraffinschnitte angefertigt. Die Aufnahmen erfolgten für die bestmögliche Vergleichbarkeit alle unter gleichen Aufnahmeparametern (Helligkeit, Belichtungszeit 1/180 Sekunden) unter Verwendung einer Nikon DS-2Mv (mit DS-L2) Kamera gekoppelt an ein Nikon Eclipse 50i Mikroskop. Anschließend erfolgte verblindet die densitometrische Messung der Färbeintensität von anti-IBA1, anti-GFAP und anti-PLP innerhalb der ROI zur Quantifizierung von entsprechend Mikrogliazellen, Astrozyten und Myelin.

Dazu wurden die Scans in das Opensource Programm Image J (NIH, Version 1.47v) importiert und dort die ROI (vgl. Abbildung 3) für jede Aufnahme individuell markiert und gespeichert. Danach wurden die Bilder in „8-bit-greyscale“ (8-bit-Graustufen) Aufnahmen umgewandelt und für die einzelnen Antikörperfärbungen ein für alle ROIs einheitlicher „Auto-Threshold“ festgelegt. Dabei handelt es sich um einen für die densitometrischen Messungen der jeweiligen Gruppen durchgängigen Schwellenwert, der entscheidet welche Pixel in der ROI gesuchte Objekte darstellen und welche der Umgebung angehören. Als Ergebnis der Densitometrie erhält man den prozentualen Anteil entsprechend IBA1-, GFAP- und PLP positiver Regionen innerhalb der ROI der Gewebeschnitte.

2.6.4 Zellzählung

Vor der Auswertung erfolgte eine gründliche Reinigung der Objektträger und die Anfertigung von lichtmikroskopischen Scans (10x Vergrößerung) der anti-OLIG2 und anti-CD3 gefärbten Paraffinschnitte. Mikroskopieren und Digitalisieren der Schnitte erfolgte mit einem Nikon Eclipse E200 Mikroskop gekoppelt mit einer Basler ace aCA 1920-40uc Kamera und der Scan-Software Manual WSIScanner (Microvisioneer; Esslingen, Deutschland).

Mit Hilfe der Software ViewPoint (PreciPoint; Freising, Deutschland) wurde die ROI manuell markiert und zur Bestimmung der Zellen pro Quadratmillimeter nach positiv-gefärbten Zellen verblindet ausgezählt.

2.6.5 Rekonstruktion und Analyse der Mikrogliamorphologie

Für die morphologische Auswertung der Mikrogliazellen wurden diese mit ihren Fortsätzen aus dreidimensionalen konfokalen Bildstapeln mit Neurolucida 360 (MBF Bioscience; Williston, USA) rekonstruiert.

Dazu wurden zunächst Übersichtsaufnahmen (10x Vergrößerung, Hellfeld, 0,8 ms Belichtungszeit) der oberen Gehirnhälfte (Grenze: unterhalb der Ventrikel) von anti-IBA1 mit Envision gefärbten Gewebeschnitte der Region 265 am Konfokalen DSU Mikroskop (Mikroskop: Olympus BX51WI mit Olympus BX-DSU mit SOLA LED Lampe) erstellt. Die manuelle Markierung der ROI erfolgte anschließend mittels der Software Stereo Investigator (MBF Bioscience; Williston; USA). Zur besseren Reproduzierbarkeit bei allen Übersichtsbildern wurde zum Einzeichnen der ROI pro Hemisphäre folgende Systematik festgelegt (Abbildung 4):

1. Linie vom medialen Rand des Ventrikels im 90° Winkel zur Lamina II (Stratum granulosum externum) bis zur äußeren Cortex-Schicht
2. Linie vom lateralen Rand des Ventrikels parallel zur 1. Linie bis zur äußeren Cortex-Schicht
3. Linie innerhalb der 1. und 2. Linie entlang des oberen Rand des CC (kleiner Sicherheitsabstand zum CC)
4. Linie parallel zur 3. Linie im Abstand von 1/3 der gemessenen Strecke zwischen CC und äußerem Cortex

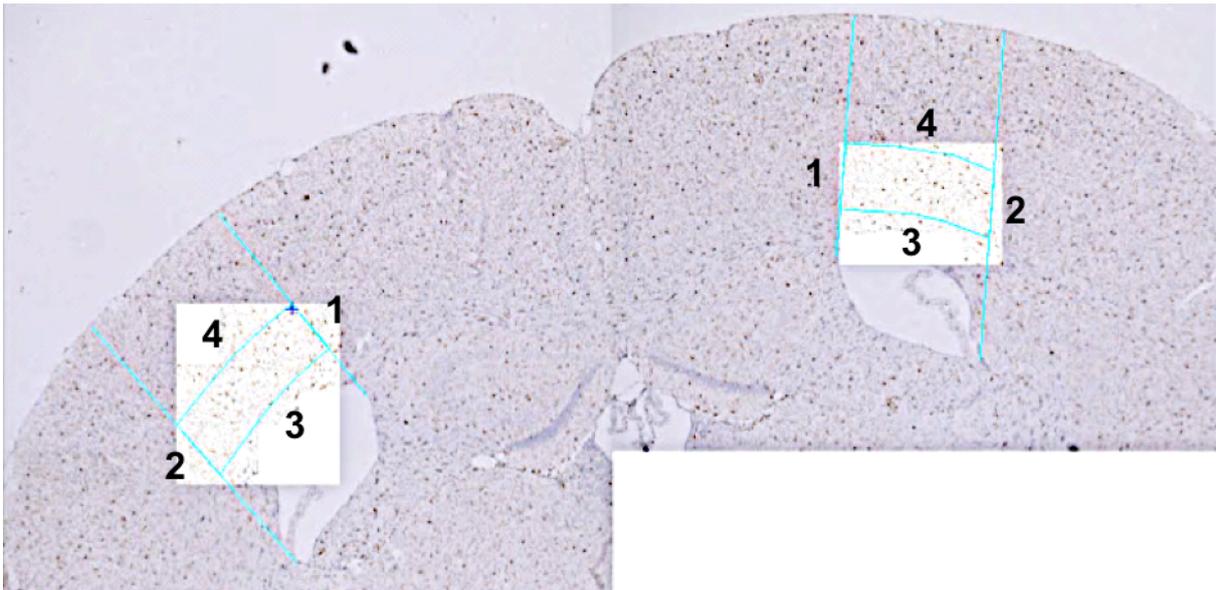


Abbildung 4: Übersichtsaufnahme mit eingezeichneter ROI

Im Anschluss erfolgte ein 3D-Scan jeder markierten ROI in 60-facher Vergrößerung am Konfokalen DSU Mikroskop (Z-Stapel-Bilder $n=40$, Schrittweite $0,5\mu\text{m}$).

Nach dem Import dieser Scans in Neurolucida 360 wurden die zu rekonstruierenden Zellen ausgewählt. Um einen Selection-Bias zu verhindern wurde ein 100×100 Grid (engl. für Gitter, Raster) bündig mit der linken oberen Bildecke über Screenshots der Scans gelegt und alle mindestens eine Mikrogliazelle enthaltenden Kästchen innerhalb der ROI von links oben nach rechts unten durchnummeriert (Abbildung 5).

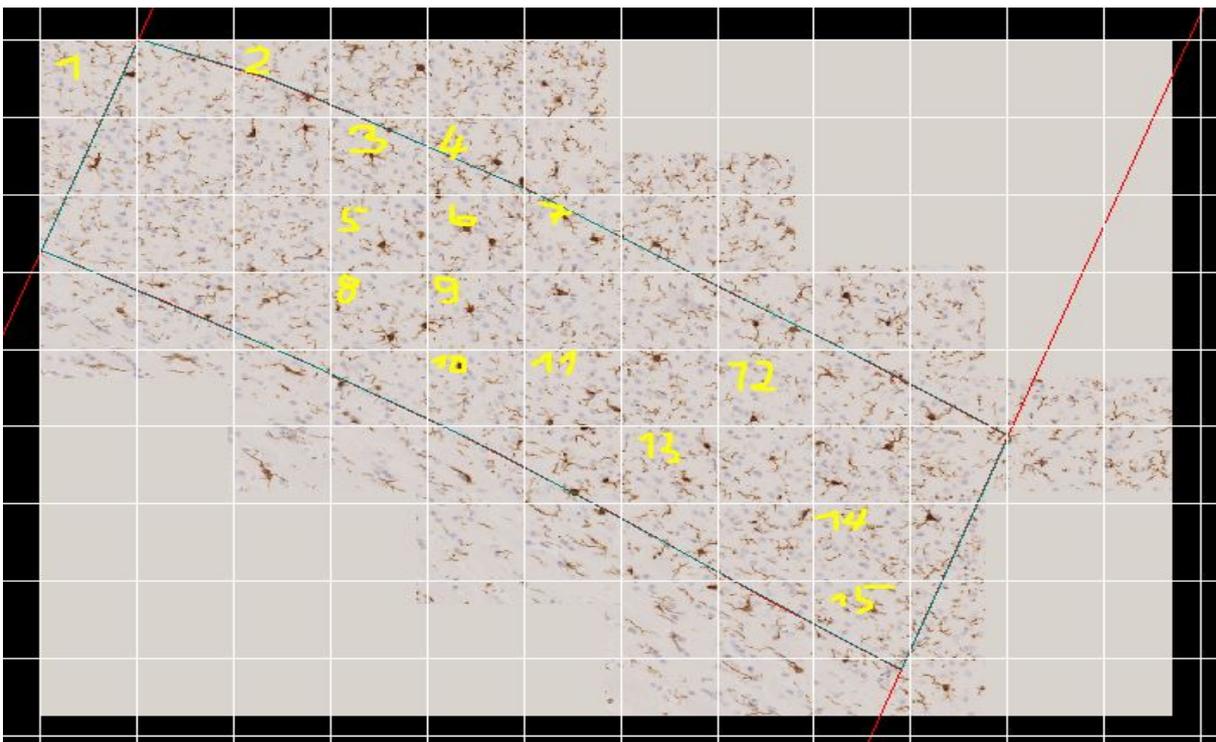


Abbildung 5: ROI mit nummeriertem Grid

Mittels Excel Zufallsgenerator erfolgte für jede ROI eine zufällige Auswahl von zwei nummerierten Kästchen. Die Mikrogliazellen innerhalb der ausgewählten Kästchen wurden in die spätere Auswertung einbezogen. Als Voraussetzung für die Rekonstruktion mussten die Somata im Fokus liegen und die Grenzen der ROI durften mit keinem Fortsatz überschritten werden. Insgesamt wurde eine Zahl von 50 Mikrogliazellen (25 aus der Kontrollgruppe und 25 aus der Cuprizone-Gruppe) auf diese Weise ausgewählt und anschließend rekonstruiert. Die Mikroglia-Rekonstruktion erfolgte verblindet und unter Einbeziehung aller Fortsätze, die innerhalb der 3-D Bildstapel eindeutig dem jeweiligen Soma zuzuordnen waren.

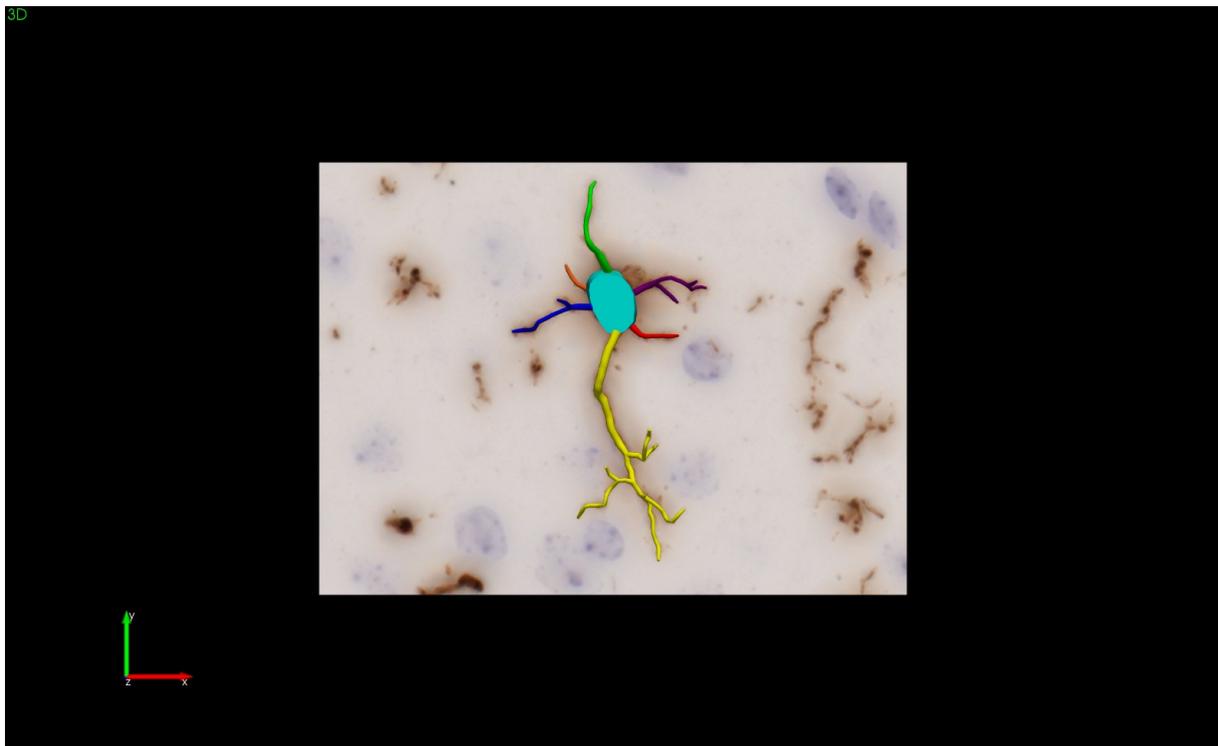


Abbildung 6: Beispiel für Rekonstruktion

Die Analyse der rekonstruierten Mikrogliazellen erfolgte nach der Sholl-Methode. Die Sholl-Analyse generiert einen Satz verschachtelter konzentrischer Kreise, die am Zellkörper zentriert sind. Der kleinste Kreis hat einen Radius von 0. Die Kreise vergrößern sich durch eine konstante Änderung des Radius (hier: 10 μm increment). Der größte Kreis wird so bestimmt, dass er groß genug ist, um alle zu bestimmenden Parameter einzuschließen. Der Mittelpunkt der Sholl-Analyse ist das Zentrum des Zellkörpers.

Eine „Shell“ ist das Volumen, das bis zum angegebenen Radius enthalten ist. Sie enthält jedoch nicht das Volumen kleinerer „Shells“. Dies bedeutet, dass die kleinste

„Shell“ ein Kreis mit dem angegebenen Radius ist. Jeder Radius entspricht einer Shell.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Length (μm): Gesamtlänge aller Fortsätze, die eine Shell durchlaufen
- Node: Verzweigungsstelle innerhalb eines Fortsatzes
- Endings: Ende eines Fortsatzanteils
- Intersection: Kreuzungsstelle zwischen einem Radius und einem jeden Fortsatzanteil der Zelle
- Volume (μm^3): durch Fortsätze eingenommenes Volumen
- Area (μm^2): Oberfläche der Fortsätze innerhalb einer Shell
- Avg. Diameter (μm): durchschnittlicher Durchmesser der Fortsätze

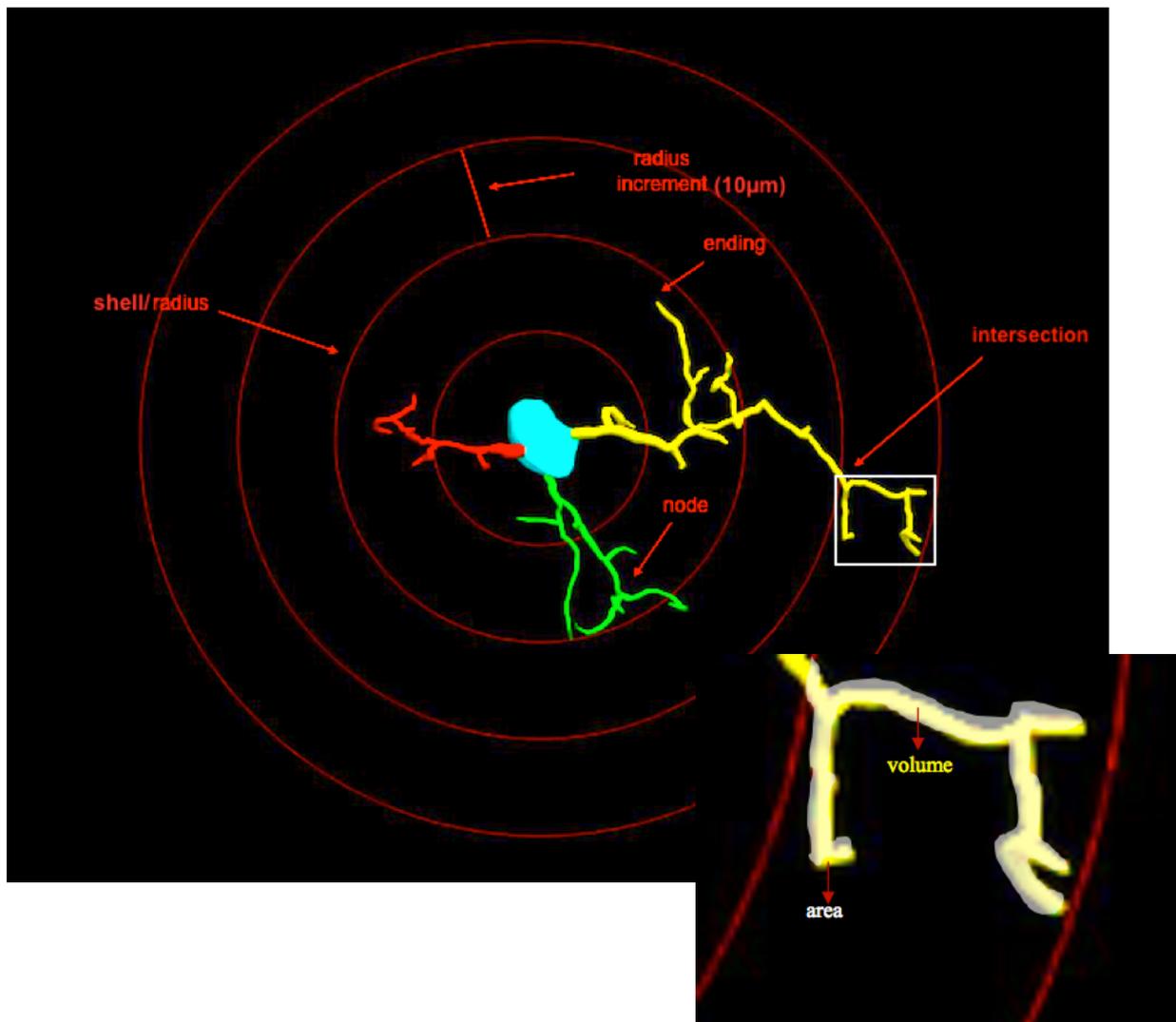


Abbildung 7: Sholl-Analyse mit Erklärung der Parameter

Neben der Sholl-Analyse wurden die rekonstruierten Mikrogliazellen noch mittels Neuron Summary und Convex Hull 3D analysiert.

Die Neuron Summary bietet einen schnellen Überblick über die Komponenten verzweigter Strukturen. Untersucht wurden die rekonstruierten Mikrogliazellen in Hinblick auf die Parameter Quantity of Extensions (Anzahl der Fortsätze), Nodes (Verzweigungsstellen), Endings (Enden), Length (Länge) und Volume (Volumen).

Die Convex Hull 3D – Analyse misst die Größe des Fortsatzfeldes, indem eine verzweigte Struktur (Mikrogliazelle) als festes Objekt interpretiert wird, das eine bestimmte Menge an physischem Raum kontrolliert. Die Größe des physischen Raums wird in Bezug auf Volumen und Oberfläche gesetzt. Die Analyse erzeugt ein konvexes Polygon, indem die Enden der Fortsätze verbunden werden, und gibt das Volumen und die Oberfläche des Polygons an.

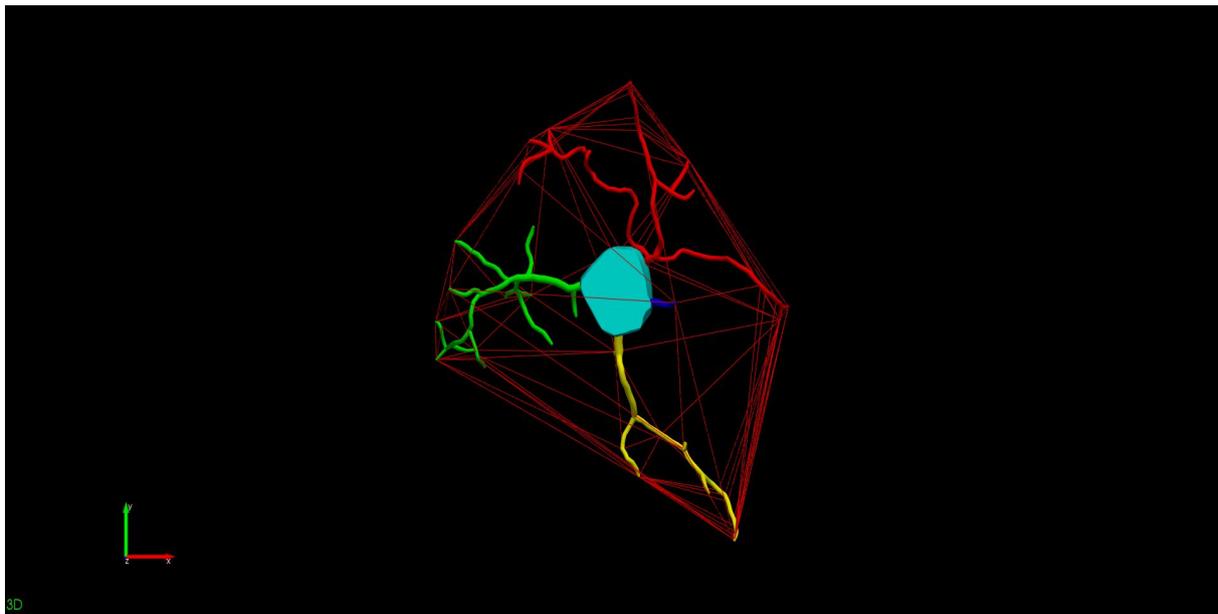


Abbildung 8: Convex Hull 3D - Analyse

Zusätzlich wurde die Morphologie der Mikrogliazellen durch die Bestimmung des sog. Ramification Index (RI) quantifiziert. Der RI ist ein Indikator für die Mikrogliaaktivität und wurde nach folgender Formel berechnet:

$RI = \text{maximales Projektionsvolumen (Vp)} / \text{Zellvolumen (Vc)}$ (Becker et al. 2018; York et al. 2018). Vp wird durch die oben beschriebene Convex Hull 3D-Analyse berechnet und repräsentiert das territoriale Volumen, das durch die prominentesten

Projektionen der Zelle definiert ist. V_c stellt das gesamte Zellvolumen (Zellkörper und Fortsätze) dar und ist ein in der Neuron Summary berechneter Parameter.

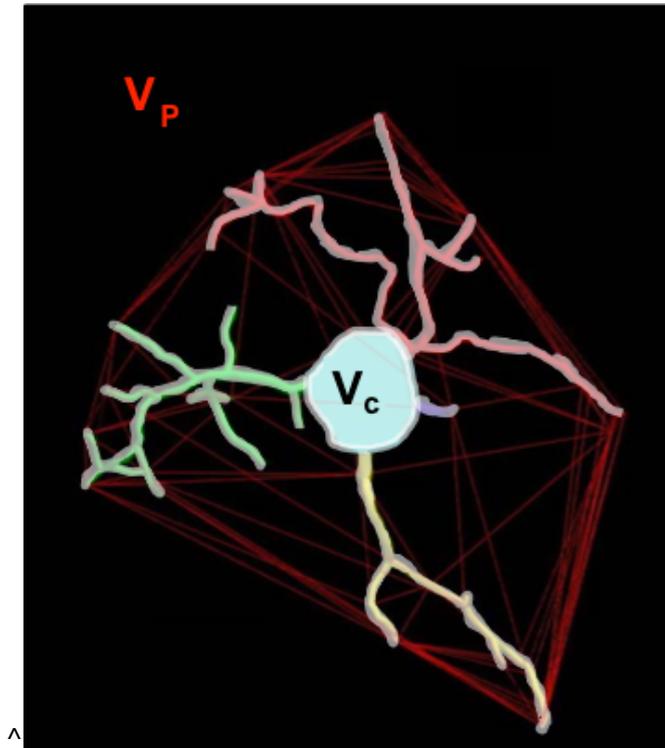


Abbildung 9: Ramification Index (RI)

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 8.1.1 für Mac, Version GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

In allen Fällen erfolgte der Kolmogorov-Smirnov-Test zur Prüfung der Normalverteilung. Parametrische Daten wurden mittels t-Test, nicht-parametrische Daten mittels Man-Whitney-U-Test auf Signifikanz zwischen zwei Gruppen geprüft. Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM = Standard Error of the Mean) angegeben. P-Werte $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und wurden mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Vollständige Remyelinisierung nach toxisch induzierter Demyelinisierung

Nach der Entfernung von Cuprizone aus der Nahrung und Umstellung auf normales Haltungsfutter wurde die Myelinisierung im CC 7 Monate später untersucht. Die Remyelinisierung im medialen und lateralen Teil des Corpus callosum wurde durch LFB/PAS-Färbung und anti-PLP-Antikörper-Färbung beurteilt.

LFB/PAS färbt Lipoproteine der Myelinscheide blau an und ist eine Myelinscheidenfärbung zur Beurteilung des Ausmaßes der Demyelinisierung nach einem standardisierten Score von 0 (keine Demyelinisierung) bis 3 (vollständige Entmarkung) (Hiremath et al.1998).

Das LFB/PAS – Scoring (Score 0 für alle Schnitte und Regionen) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Cuprizone-Tieren im Bereich des mCC und des ICC.

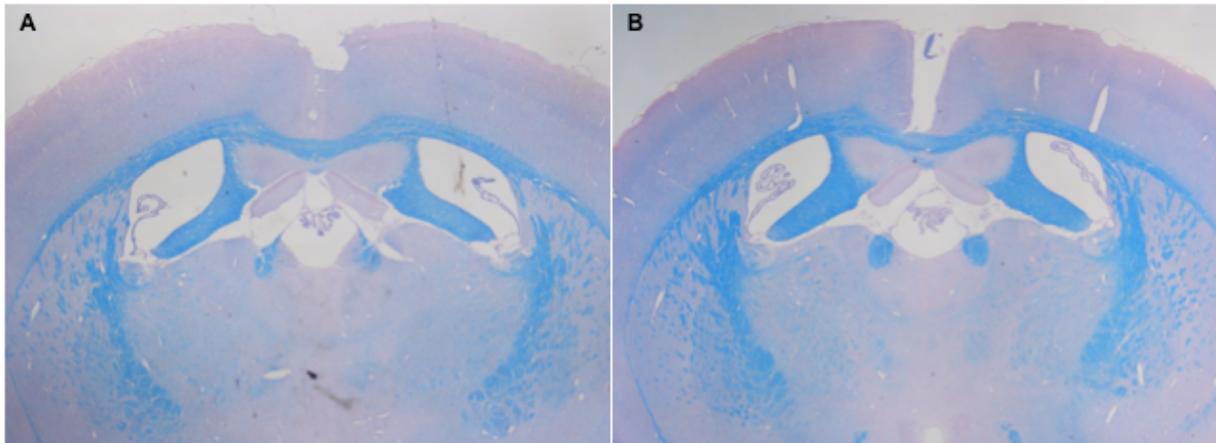


Abbildung 10: LFB - Färbung der Region 265 zur Darstellung von Myelin

(A) zeigt eine Übersichtsaufnahme der Region 265 eines Kontrolltiers und (B) eines Cuprizone-Tiers. Visuell zeigt sich eine vergleichbare Myelinisierung in beiden Gruppen (Score 0).

Ergebnisse

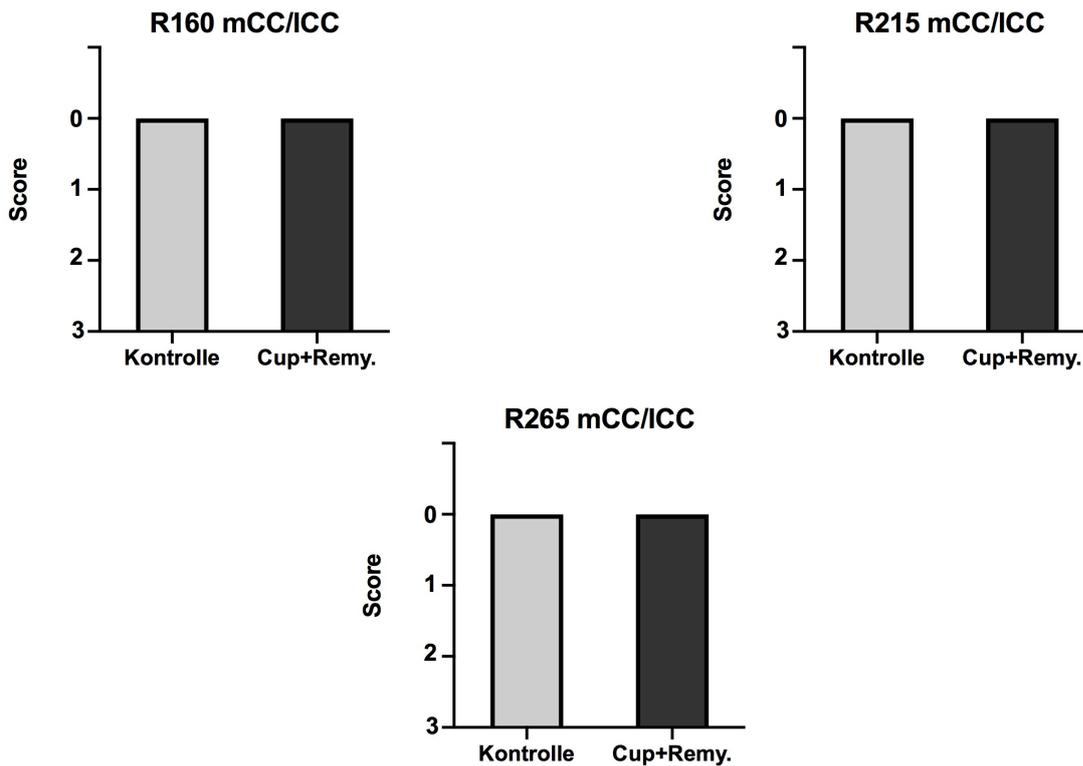


Abbildung 11: Graphische Darstellung des LFB/PAS - Scorings zum Myelinisierungsgrad bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone-Tieren in den Regionen 160, 215 und 265

Das Corpus callosum (CC) in Kontroll- und Cuprizone-Tieren zeigt sich vollständig myelinisiert (Score 0).

PLP ist das am häufigsten vorkommende Protein der Myelinscheide von Nervenzellen und kann ebenso als Demyelinisierungsmarker herangezogen werden.

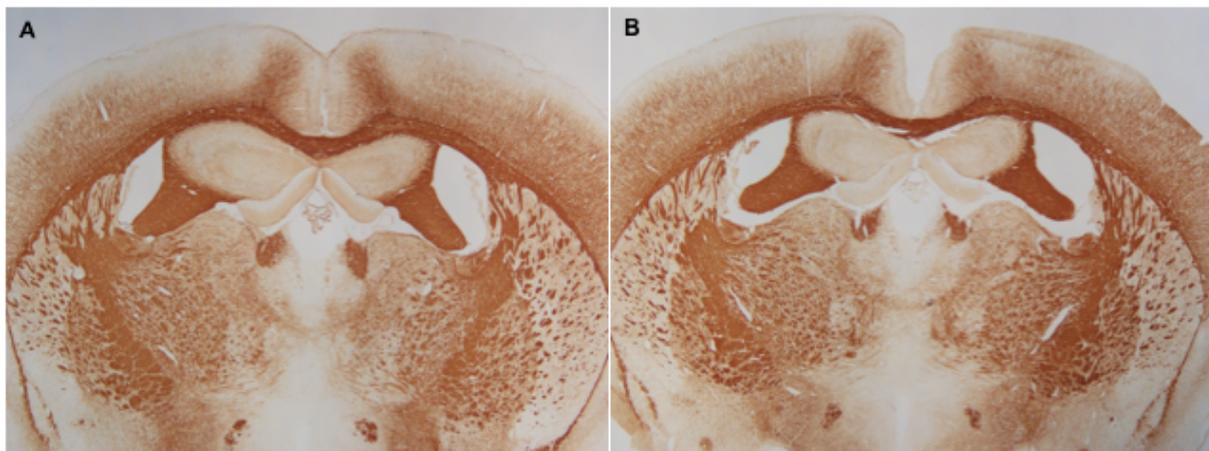


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung der Region 265 mit PLP zur Darstellung von Myelin

(A) zeigt eine Übersichtsaufnahme der Region 265 eines Kontrolltiers und (B) eines Cuprizone-Tiers. Visuell zeigt sich eine vergleichbare Myelinisierung in beiden Gruppen.

In der Region 160 (mCC Cup $95,03 \pm 2,17$ vs. Kontrolle $95,90 \pm 1,85$ mean area % und ICC Cup $92,29 \pm 1,95$ vs. Kontrolle $92,57 \pm 1,98$ mean area %), der Region 215

Ergebnisse

(mCC Cup $96,10 \pm 0,92$ vs. Kontrolle $94,69 \pm 1,22$ mean area% und ICC Cup $95,08 \pm 0,62$ vs. Kontrolle $95,75 \pm 0,82$ mean area %) und Region 265 (mCC Cup $96,33 \pm 0,98$ vs. Kontrolle $96,88 \pm 0,50$ mean area % und ICC Cup $95,87 \pm 0,49$ vs. Kontrolle $95,76 \pm 0,69$ mean area %) zeigte die densitometrische Quantifizierung von PLP keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$ mCC und ICC in allen Regionen) zwischen Kontroll- und Cuprizon-Tieren.

Es ist somit von einer vollständigen Remyelinisierung nach Beendigung der 5-wöchigen Cuprizon-Fütterung auszugehen.

Ergebnisse

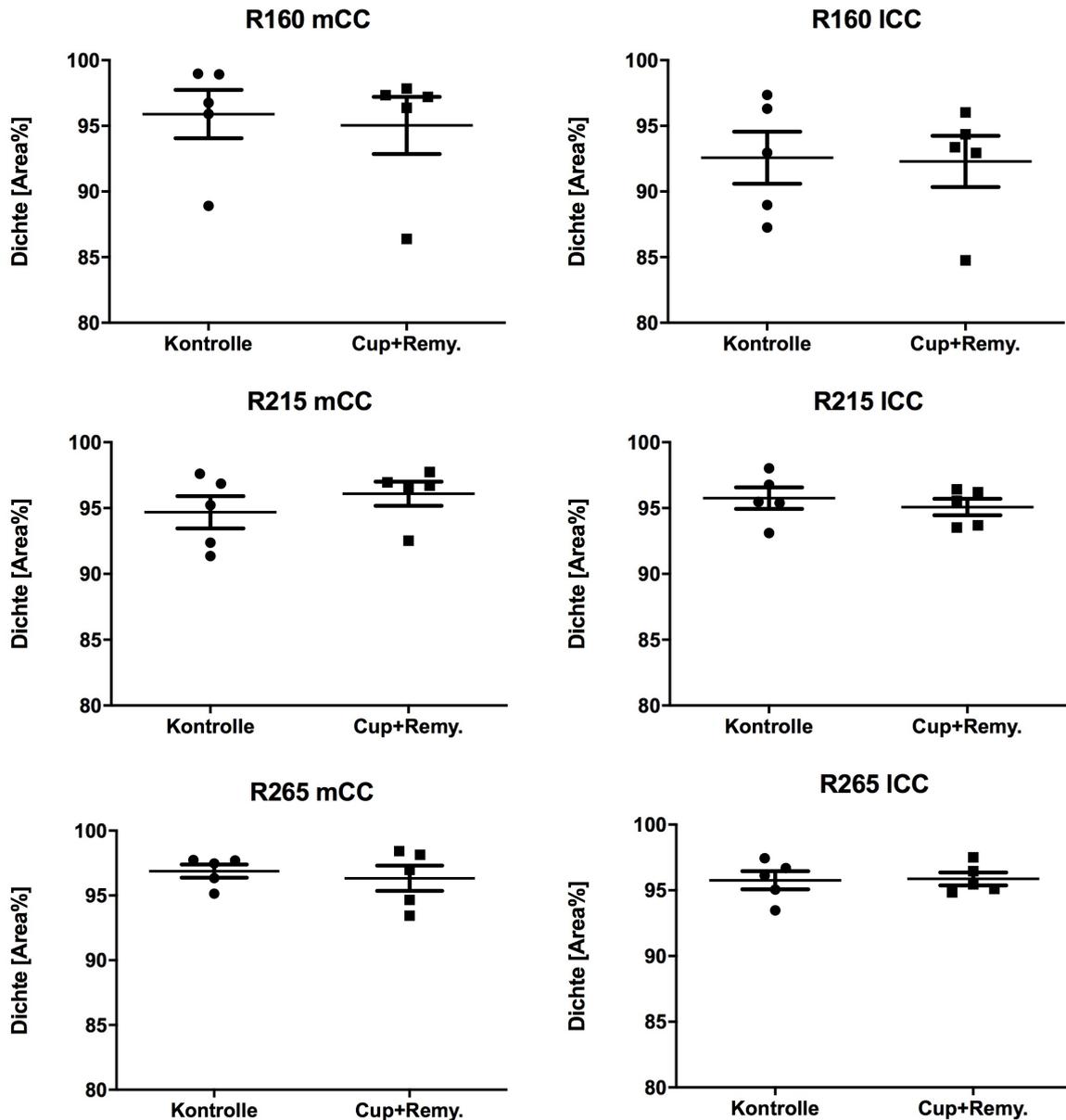


Abbildung 13: Graphische Darstellung der PLP-Dichte im medialen und lateralen Corpus callosum bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone-Tieren in den Regionen 160, 215 und 265

Die Abbildung zeigt eine vergleichbare Dichte von PLP zwischen Kontrolltieren und Cuprizone-Tieren im mCC und ICC in den Regionen 160, 215 und 265.
Threshold: Shanbhag

OLIG2, ein Oligodendrozyten – Transkriptionsfaktor, erlaubt als Surrogatmarker die Quantifizierung von Oligodendrozyten. Die Hauptfunktion von Oligodendrozyten ist die Myelinisierung im ZNS. Histopathologisch stellt die Oligodendrozyten-Apoptose ein wichtiges Merkmal der Cuprizone-Behandlung dar.

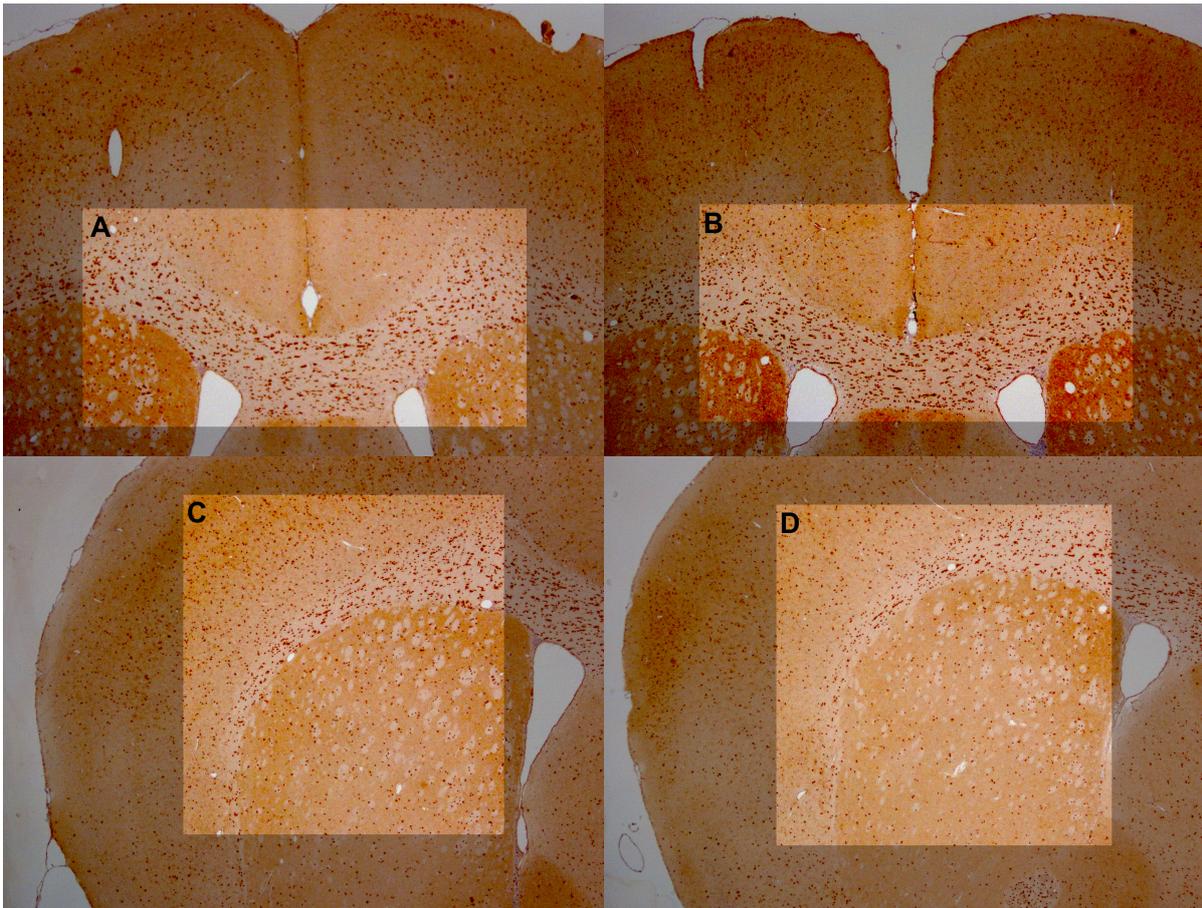


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung der Region 160 mit OLIG2 zur Darstellung von Oligodendrozyten

(A) zeigt das mediale Corpus callosum (mCC) bei einem Kontrolltier und (B) bei einem Cuprizone-Tier. (C) zeigt das laterale Corpus callosum (ICC) bei einem Kontrolltier gegenüber einem Cuprizone-Tier in (D). Die Zahl OLIG2-positiver Zellen ist im Bereich des mCC und des ICC bei Kontrolltieren und Cuprizone-Tieren annähernd gleich. Gleiches gilt für die Regionen 215 und 265.

Die Quantifizierung OLIG2-positiver Zellen mittels Auszählung ergab für die Region 160 (mCC Cup $1333 \pm 70,81$ Anzahl/mm² vs. Kontrolle $1357 \pm 85,43$ Anzahl/mm² und ICC Cup $1087 \pm 37,07$ Anzahl/mm² vs. Kontrolle $1140 \pm 60,17$ Anzahl/mm²), die Region 215 (mCC Cup $1368 \pm 77,04$ Anzahl/mm² vs. Kontrolle $1245 \pm 103,7$ Anzahl/mm² und ICC Cup $1262 \pm 69,99$ Anzahl/mm² vs. Kontrolle $1245 \pm 56,96$ Anzahl/mm²) und die Region 265 (mCC Cup $1225 \pm 125,9$ Anzahl/mm² vs. Kontrolle $1349 \pm 51,90$ Anzahl/mm² und ICC Cup $1003 \pm 51,84$ Anzahl/mm² vs. Kontrolle $989,5 \pm 52,63$ Anzahl/mm²) vergleichbare Oligodendrozytenzahlen in Cuprizone-Tieren und Kontrolltieren (Abbildung 15).

Ergebnisse

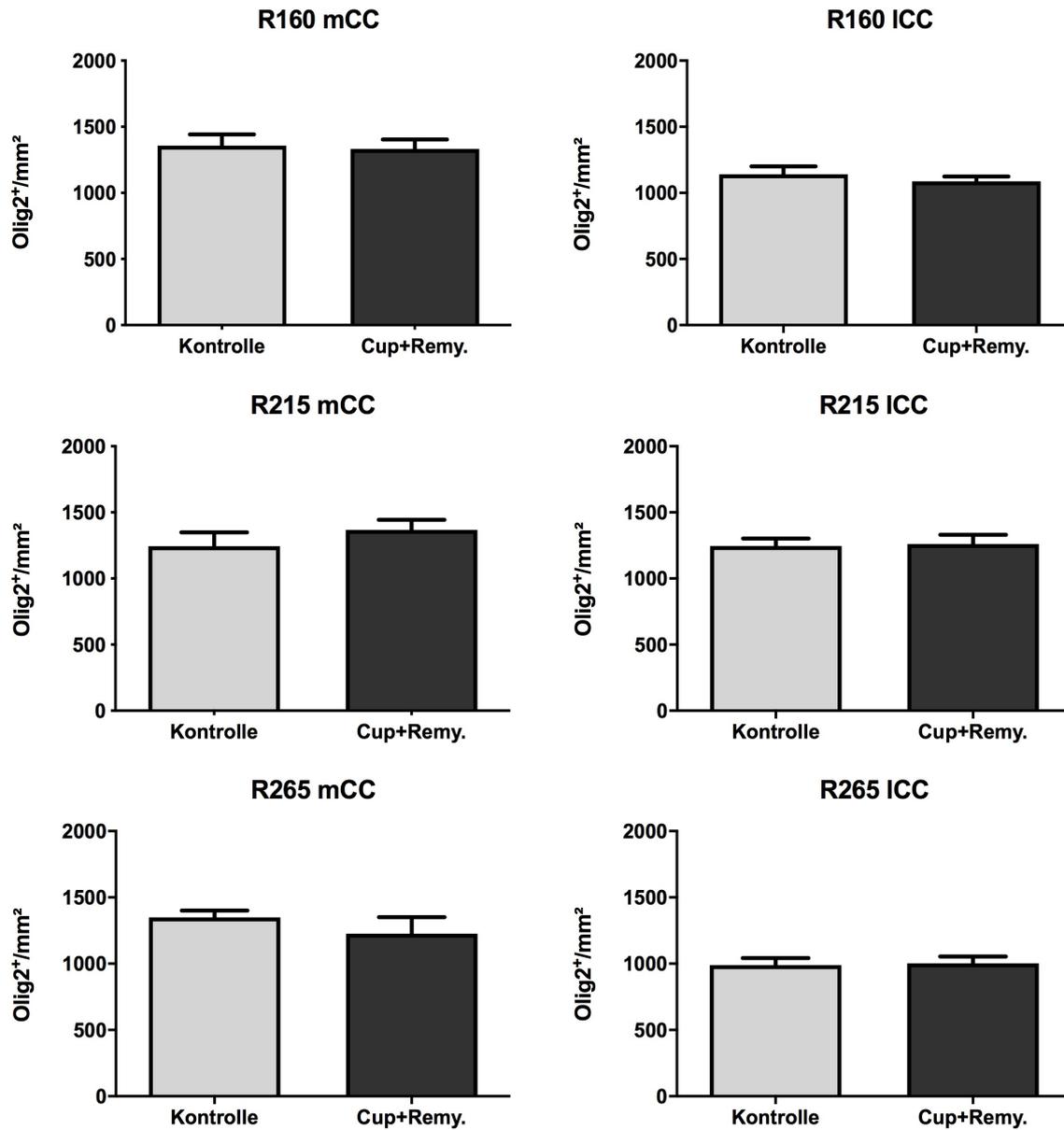


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Oligodendrozytenzahl im medialen und lateralen Corpus callosum bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone-Tieren in den Regionen 160, 215 und 265

Die Abbildung zeigt vergleichbare Oligodendrozytenzahlen in Cuprizone-Tieren und Kontrolltieren im Bereich des mCC und des ICC in den Regionen 160, 215 und 265.

3.2 Anhaltende Mikrogliazellaktivierung nach Remyelinisierung

IBA1 ist im Gehirn spezifisch für Mikrogliazellen und wird bei Aktivierung selbiger verstärkt gebildet (Ito et al. 1998). Eine Mikrogliose tritt begleitend zur Demyelinisierung auf und ist ein sensibler Marker für pathologische Vorgänge im Gehirn (Kipp et al. 2011).

In der Region 160 zeigt sich die Mikroglia-dichte im mCC und ICC bei Cuprizone-Tieren erhöht (mCC Cup $7,59 \pm 0,56$ mean area % vs. Kontrolle $5,68 \pm 0,76$ mean area % ($p=0,056$) und ICC Cup $8,94 \pm 0,79$ mean area % vs. Kontrolle $5,68 \pm 0,96$ mean area % ($p=0,056$)). In der Region 215 zeigt sich die Mikroglia-dichte im mCC und ICC bei Cuprizone-Tieren im Mittel jeweils erhöht (mCC Cup $4,30 \pm 0,18$ vs. Kontrolle $3,44 \pm 0,27$ mean area % und Cup $4,30 \pm 0,18$ ($p=0,056$) und ICC Cup $6,57 \pm 0,78$ vs. Kontrolle $3,85 \pm 0,74$ mean area % ($p=0,032$)). In der Region 265 zeigt sich eine signifikante Erhöhung der mittleren Dichte an Mikrogliazellen (mCC Cup $7,21 \pm 1,32$ mean area % vs. Kontrolle $3,29 \pm 0,32$ mean area % ($p = 0,032$) und ICC Cup $7,13 \pm 0,85$ mean area % vs. Kontrolle $3,47 \pm 0,25$ mean area % ($p = 0,008$)).

Die mittlere Mikroglia-dichte ist in den Cuprizone-Tieren in allen Regionen im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht. Die hohe Signifikanz der Ergebnisse in Region 265 spiegelt die Regionenspezifität des Cuprizone-Modells wider, das gerade für den Mittellinienbereich des CC (R265) eine valide reproduzierbare Demyelinisierung ermöglicht (Goldberg et al. 2015).

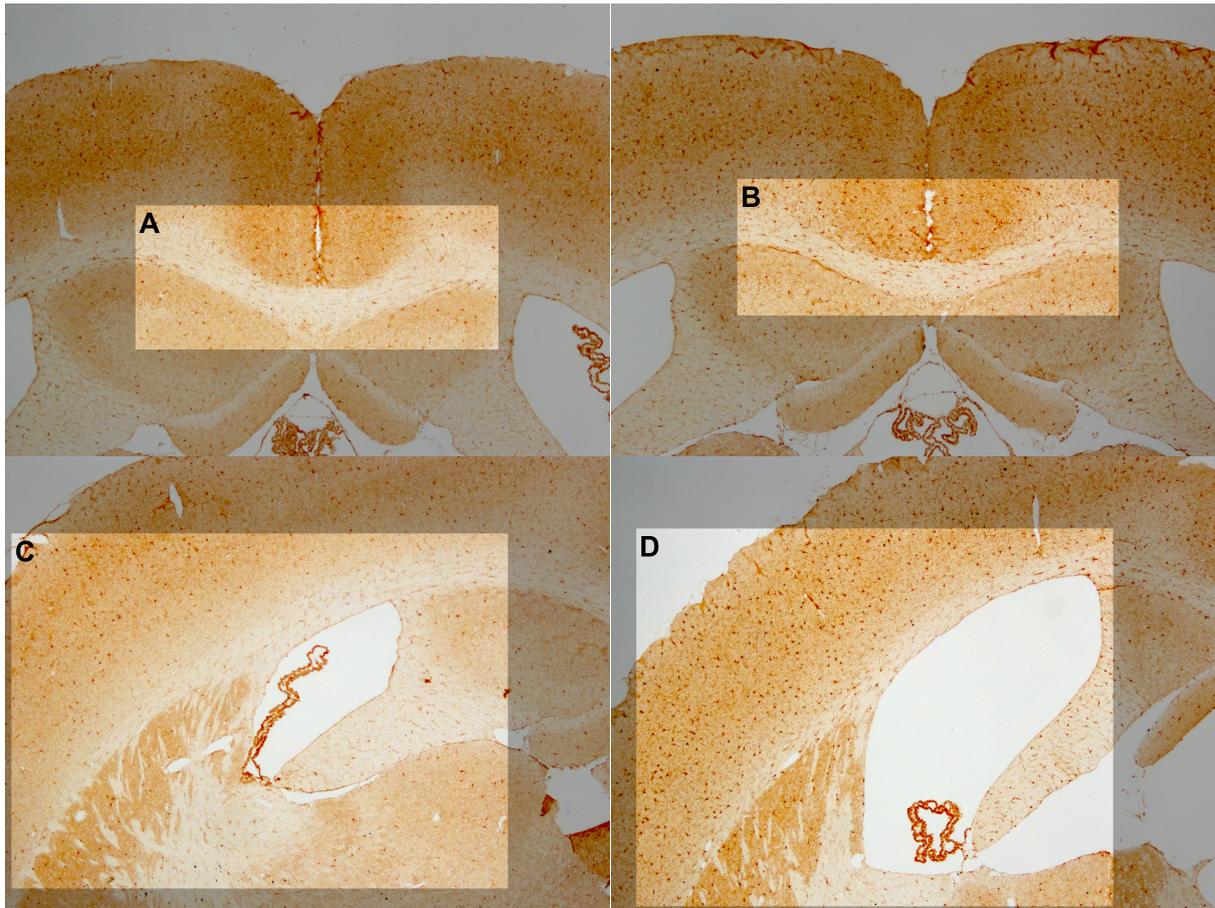


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung der Region 265 mit IBA1 zur Darstellung von Mikrogliazellen

(A) zeigt das mediale Corpus callosum (mCC) bei einem Kontrolltier und (B) bei einem Cuprizone-Tier. (C) zeigt das laterale Corpus callosum (ICC) bei einem Kontrolltier gegenüber einem Cuprizone-Tier in (D). Visuell zeigt sich eine höhere Mikroglia-dichte in der Cuprizone-Gruppe.

Ergebnisse

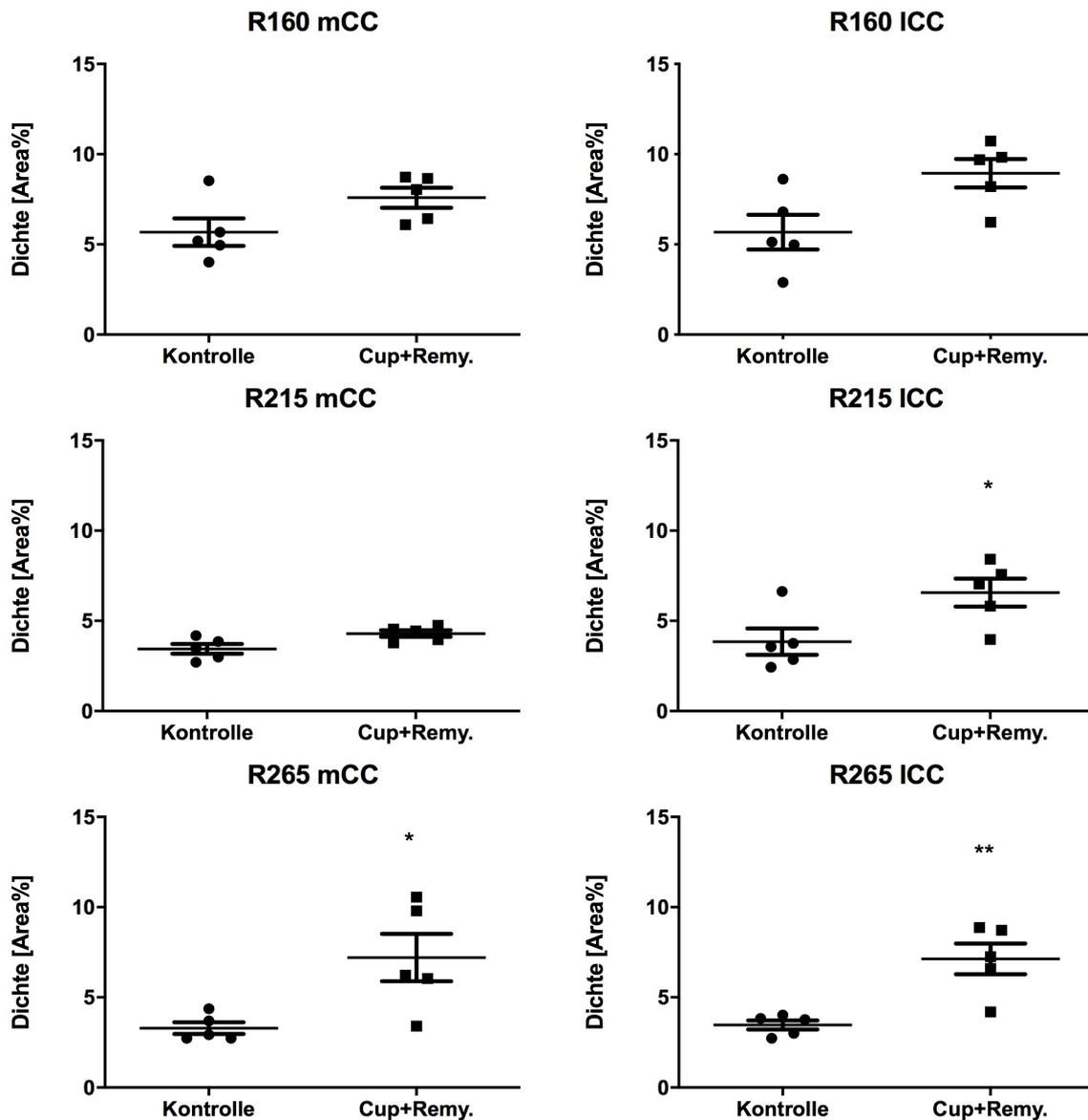


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Mikroglia-dichte im medialen und lateralen Corpus callosum bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone-Tieren in den Regionen 160, 215 und 265

Die Abbildung zeigt eine höhere Mikroglia-dichte bei den Cuprizone-Tieren, jedoch im mCC und ICC ohne statistische Signifikanz ($p=0,056$) in der Region 160. In der Region 215 zeigt sich eine signifikant höhere Mikroglia-dichte im ICC ($p=0,032$) bei den Cuprizone-Tieren. In der Region 265 ist die Mikroglia-dichte bei den Cuprizone-Tieren im mCC signifikant ($p=0,032$) und im ICC hochsignifikant ($p=0,008$) erhöht.

Threshold: Moments

3.3 Persistierende Astrozytose nach Remyelinisierung

GFAP ist ein Protein, das als Hauptbestandteil der Intermediärfilamente im Cytoplasma von Astrozyten im ZNS vorkommt. Die GFAP-Färbung erlaubt somit den Nachweis einer Astrozytose, die als weiteres Kennzeichen der Cuprizone-Behandlung begleitend zur Mikrogliose auftritt (Goldberg et al. 2015).

Im Bereich des mCC zeigt sich bei den Cuprizone-Tieren in der Region 160 (Cup $8,59 \pm 0,40$ vs. Kontrolle $5,90 \pm 0,82$ mean area % ($p = 0,016$)) eine signifikante Erhöhung der Dichte GFAP-positiver Zellen. Im Bereich des ICC (Cup $15,23 \pm 2,47$ vs. Kontrolle $9,39 \pm 1,51$ mean area % ($p=0,15$)) zeigt sich die Dichte an GFAP-positiven Zellen ebenfalls erhöht, wenn auch nicht signifikant. In der Region 215 kann kein signifikanter Unterschied in der Dichte GFAP-positiver Zellen zwischen Cuprizone-Tieren und Kontrolltieren (Cup $4,20 \pm 0,39$ vs. Kontrolle $4,25 \pm 0,69$ mean area % ($p=0,84$); ICC Cup $10,34 \pm 0,88$ vs. Kontrolle $9,70 \pm 1,60$ mean area % ($p = 1,000$)) nachgewiesen werden. Im Bereich des mCC zeigt sich bei den Cuprizone-Tieren in der Region 265 (Cup $13,87 \pm 4,59$ vs. Kontrolle $2,71 \pm 0,73$ mean area % ($p = 0,032$)) eine signifikante Erhöhung der Dichte GFAP-positiver Zellen. Im Bereich des ICC (Cup $9,33 \pm 1,47$ vs. Kontrolle $5,66 \pm 1,14$ mean area % ($p=0,056$)) zeigt sich keine signifikante Erhöhung der Astrozytendichte.

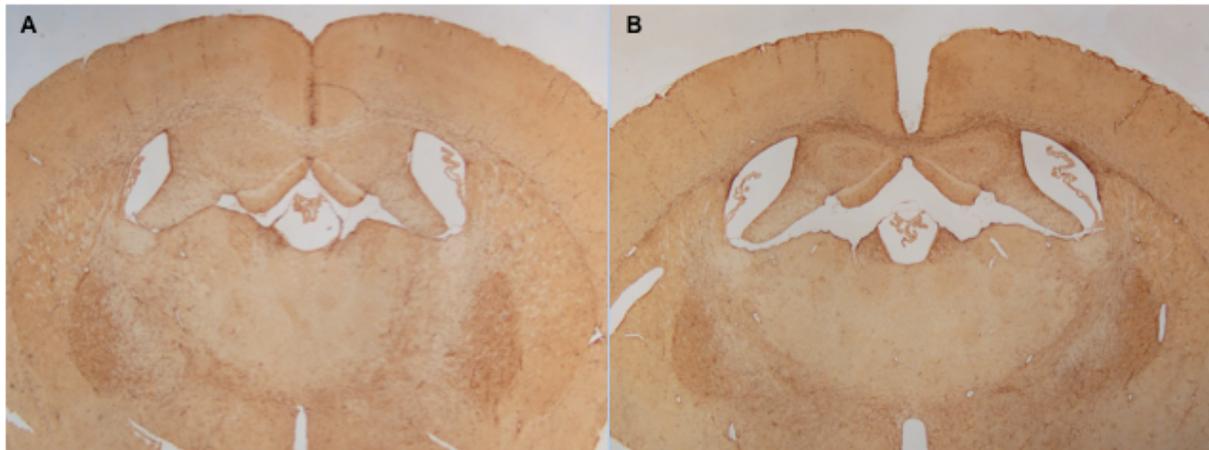


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung der Region 265 mit GFAP zur Darstellung von Astrozyten

(A) zeigt eine Übersichtsaufnahme der Region 265 eines Kontrolltiers und (B) eines Cuprizone-Tiers. Visuell zeigt sich eine höhere Dichte GFAP-positiver Zellen im mCC beim Cuprizone-Tier.

Ergebnisse

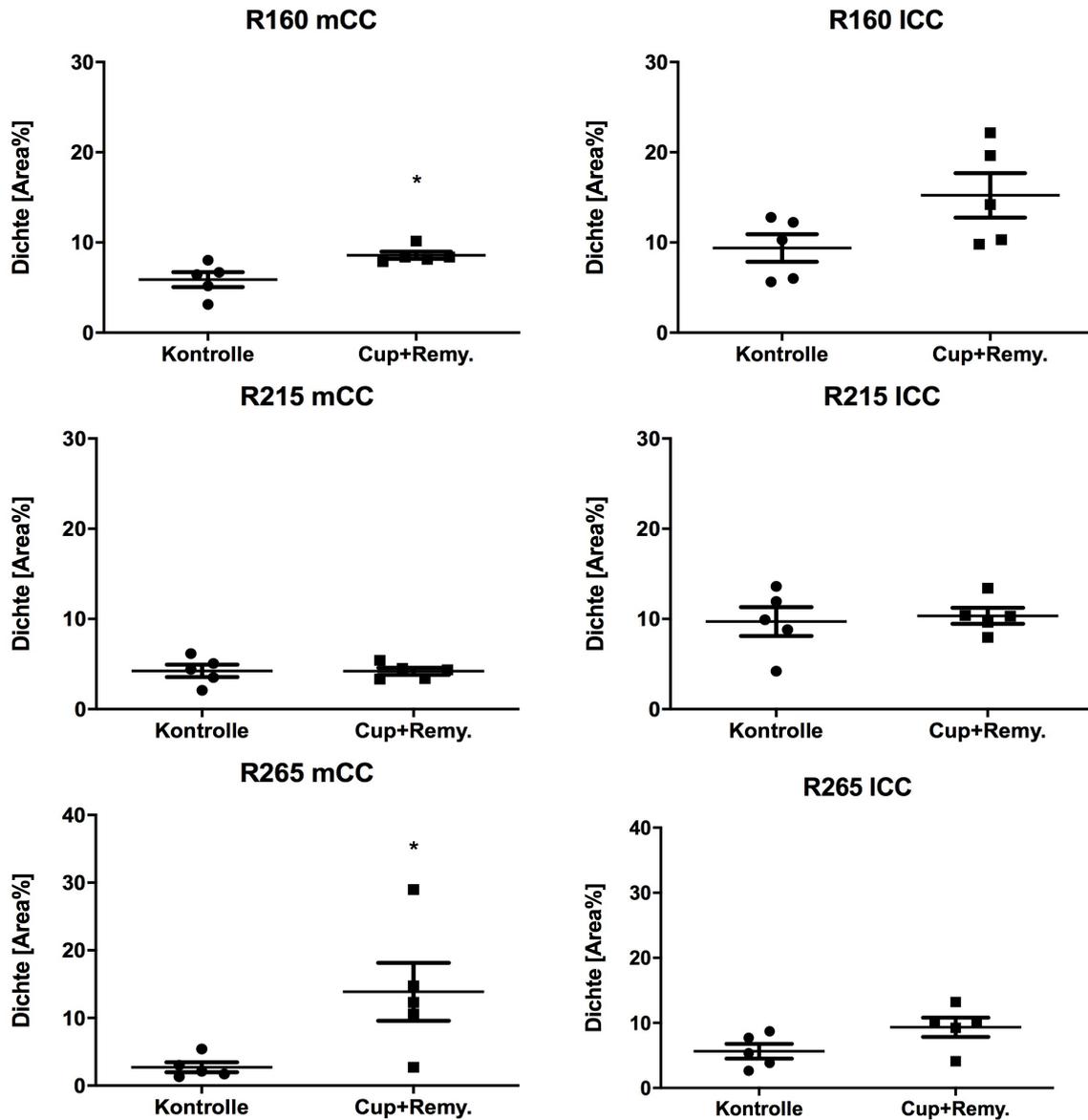


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Astrozytendichte im medialen und lateralen Corpus callosum bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone-Tieren in den Regionen 160, 215 und 265

Die Abbildung zeigt eine signifikant höhere Dichte GFAP-positiver Zellen im Bereich des mCC in den Regionen 160 ($p=0,016$) und 265 ($p=0,032$) bei den Cuprizone-Tieren. Im Bereich des ICC zeigt sich die Dichte in den beiden Regionen bei den Cuprizone-Tieren insgesamt im Mittel ebenfalls erhöht jedoch ohne statistische Signifikanz. In der Region 215 zeigt sich kein Unterschied im ICC und mCC der beiden Gruppen.

Threshold: Renyi Entropy.

3.4 Fehlende Rekrutierung von T-Zellen nach Cuprizone-Intoxikation

CD 3 ist ein T-Zell-Marker mit dem untersucht werden kann ob T-Zellen in das Gehirn gelangt sind. Somit können Rückschlüsse auf autoimmunvermittelte inflammatorische Prozesse gezogen werden.

Die Auszählung zeigt keinen statistisch signifikanten Anstieg CD 3-positiver T-Lymphozyten bei Kontrolltieren und Cuprizone-Tieren.

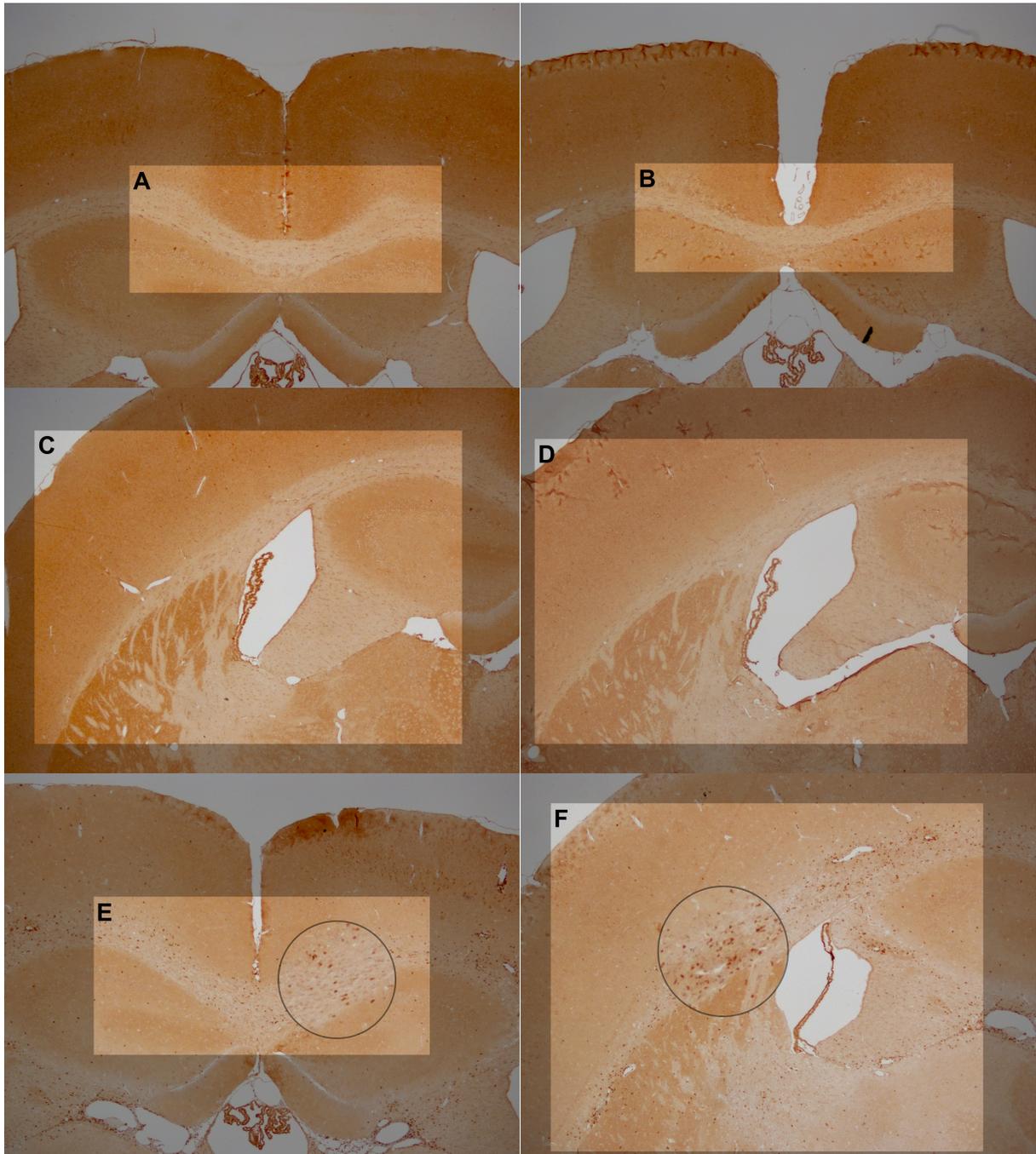


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung der Region 265 mit CD3 zur Darstellung von T-Lymphozyten

(A) zeigt das mediale Corpus callosum bei einem Kontrolltier und (B) bei einem Cuprizone-Tier. (C) zeigt das laterale Corpus callosum bei einem Kontrolltier gegenüber einem Cuprizone-Tier in (D). (E) und (F) zeigen zum Vergleich einen Ausschnitt des mCC und ICC einer EAE - immunisierten Maus (Positivkontrolle) mit erhöhter CD3-Expression im Gegensatz zu fehlender Expression in (A), (B), (C) und (D). Kreise zeigen den vergrößerten Ausschnitt.

3.5 Reaktiver Mikroglia-Phänotyp nach Remyelinisierung

In der Densitometrie zeigte sich eine erhöhte Mikroglia-dichte im CC der Cuprizone-Tiere. Um die Auswirkungen der toxischen Demyelinisierung auf morphologischer Ebene zu untersuchen wurden im Bereich der Region 265 Mikrogliazellen der Schichten 5 und 6 des pScx von je 25 Kontroll- und Cuprizone- Tieren mittels 3D-Rekonstruktion analysiert und die anatomischen Merkmale der Zellen, insbesondere der Fortsätze, verglichen. Zur Auswertung erfolgten die Sholl- Analyse, die Neuron Summary, die Convex Hull 3D-Analyse und die Berechnung des Ramification Index. Die Mikrogliazellen waren im Allgemeinen in beiden Gruppen gleichmäßig in der untersuchten Region verteilt. Bei der morphologischen Analyse zeigte sich im Hinblick auf die Konfiguration der Fortsätze (Länge, Verzweigungen) ein heterogenes Zellmuster.

Insgesamt konnten bei den Cuprizone-Tieren größere Mikrogliazellen mit längeren und verzweigteren Fortsätzen beobachtet werden als bei den Kontrollen (siehe Abb. 21).

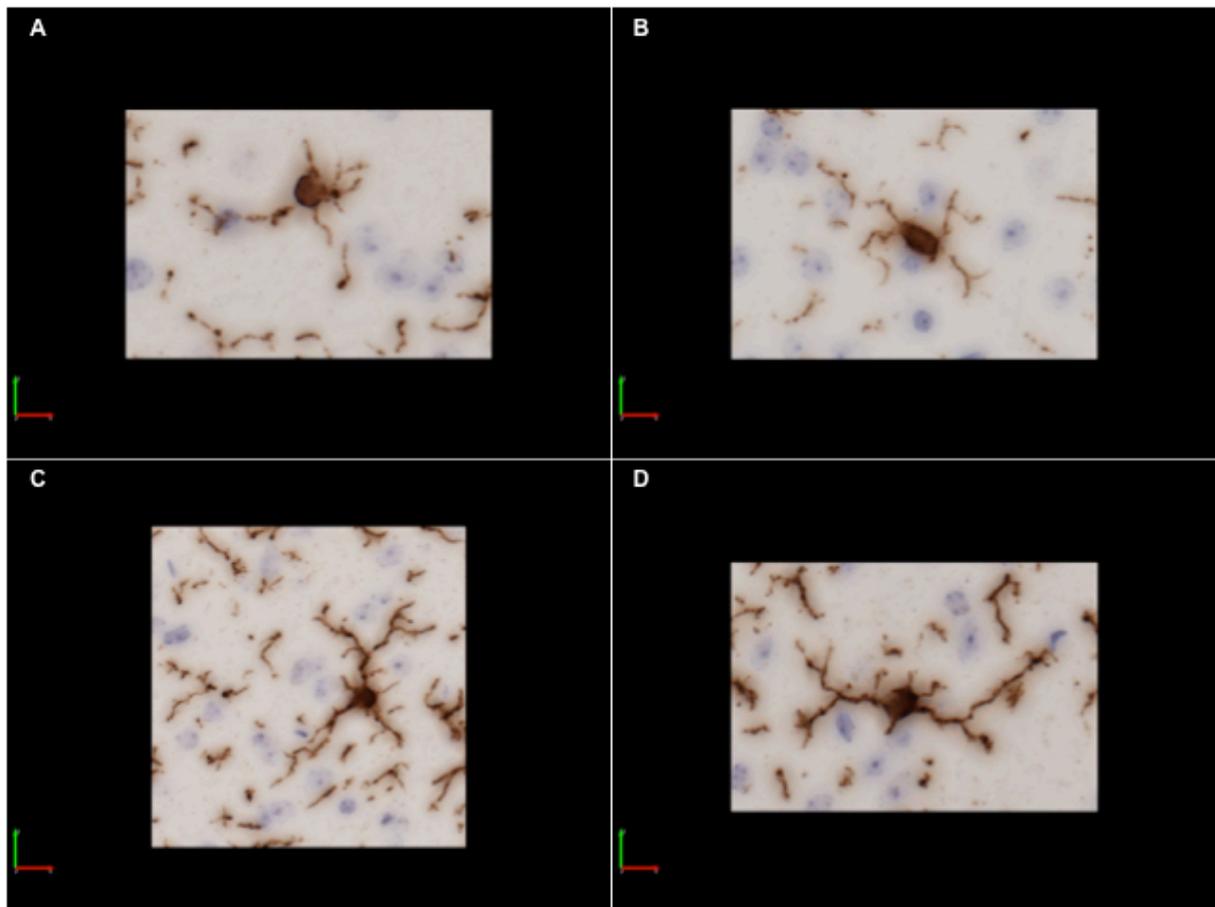


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von Mikroglia (Färbung IBA1)

(A) und (B) zeigen Mikrogliazellen von Kontrolltieren, (C) und (D) von Cuprizone-Tieren. Die Mikrogliazellen in (C) und (D) erscheinen größer, verzweigter und mit längeren Fortsätzen als in (A) und (B).

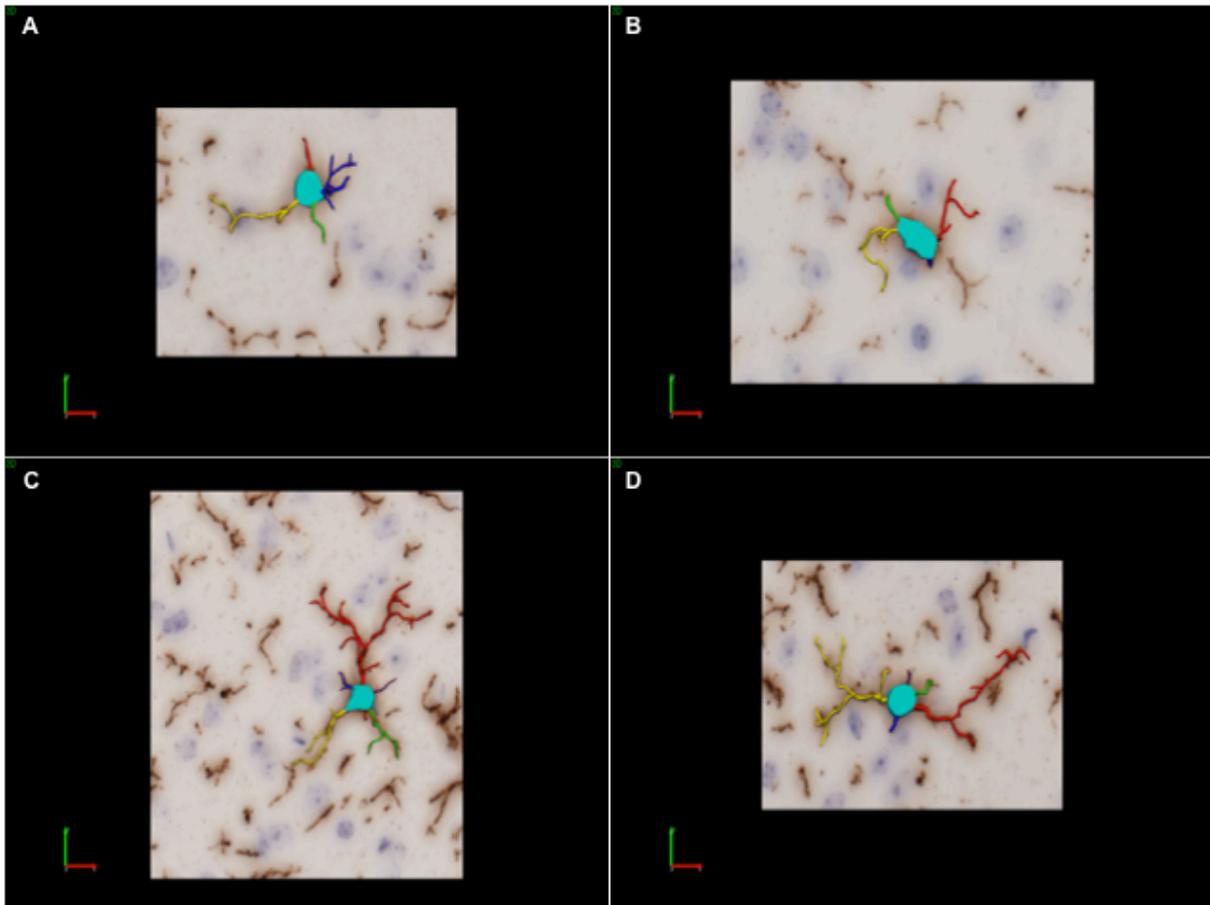


Abbildung 22: Rekonstruktion der Mikrogliazellen aus Abbildung 21 mittels Neurolucida 360

(A) und (B) zeigen rekonstruierte Mikrogliazellen von Kontrolltieren und (C) und (D) rekonstruierte Mikrogliazellen von Cuprizone-Tieren zur anschließenden Auswertung mittels Sholl-, Neuron Summary- und Convex Hull 3D - Analyse.

Die Sholl-Analyse ist eine quantitative Analyse zur Charakterisierung der Mikrogliamorphologie. Zur Beschreibung der Zellform wurden die Fortsatz-Parameter Length (Länge), Nodes (Verzweigungsstellen innerhalb eines Fortsatzes), Endings (Ende eines Fortsatzes), Intersections (Kreuzung zwischen Fortsatz und Radius), Volume (durch Fortsatz eingenommenes Volumen), Area (Fortsatzoberfläche) und Avg. Diameter (durchschnittlicher Durchmesser der Fortsätze) gewählt. Der Radiuszuwachs betrug $10\ \mu\text{m}$ pro Shell.

Hier zeigten sich jeweils höhere mittlere Werte für die untersuchten morphologischen Parameter innerhalb der einzelnen Shells bei den Tieren der Cuprizone-Gruppe. Der maximale Radius um den Zellkörper innerhalb dessen sowohl bei Kontrolltieren als auch bei den Cuprizone-Tieren Fortsätze zu finden waren lag bei $40\ \mu\text{m}$ (siehe Abb. 23).

Ergebnisse

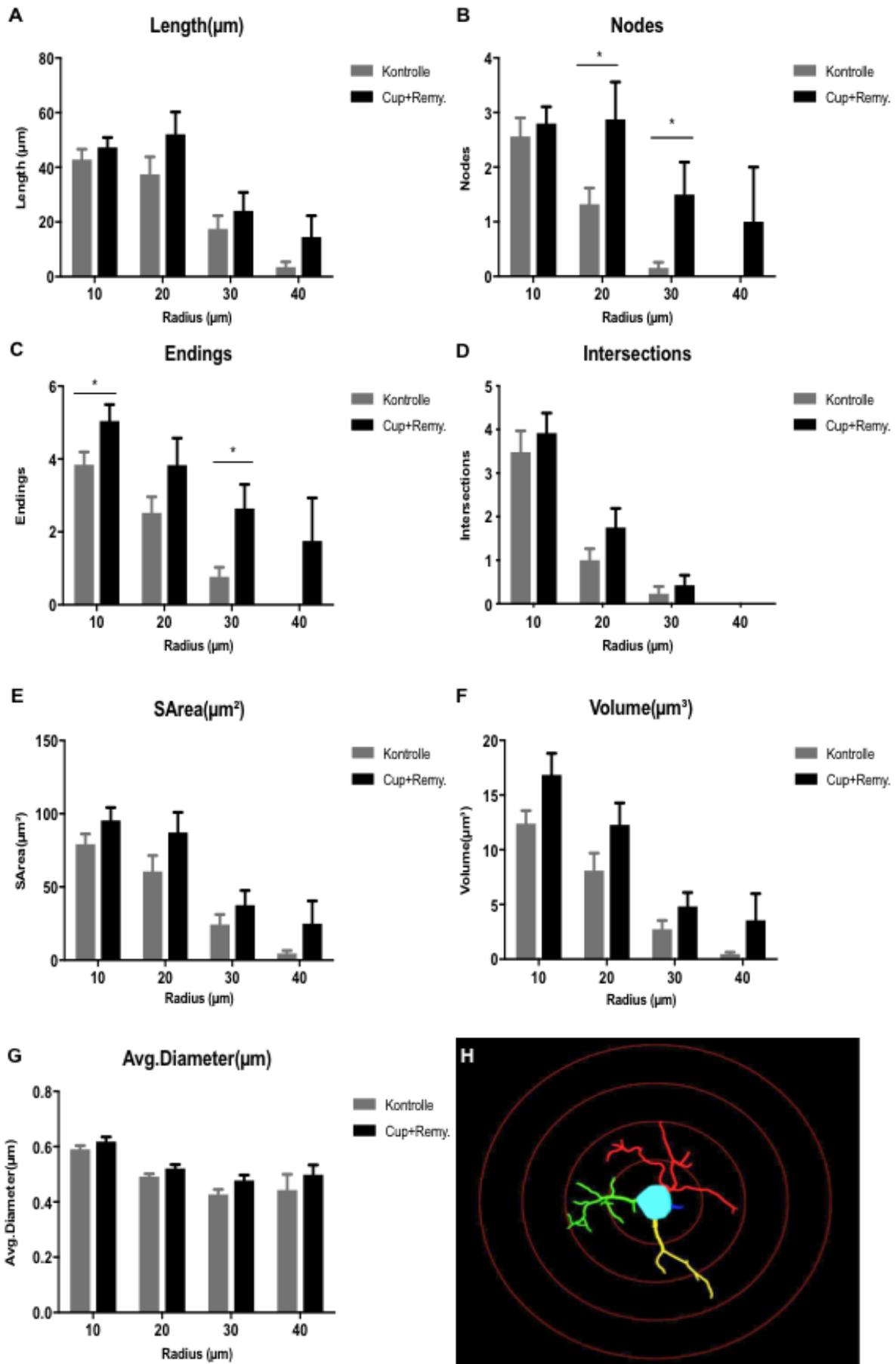


Abbildung 23: Ergebnisse Sholl-Analyse bei einem Radiuszuwachs (increment) von 10 μm

Ergebnisse

Graphische Darstellung der morphologischen Parameter **(A)** Length, **(B)** Nodes, **(C)** Endings, **(D)** Intersections, **(E)** SArea, **(F)** Volume und **(G)** Avg. Diameter von Kontroll- und Cuprizone-Tieren pro Shell. **(H)** zeigt die Sholl-Analyse einer rekonstruierten Mikrogliazelle mit einem Radiuszuwachs von 10 µm. Innerhalb jeder Shell liegen die Werte für die einzelnen Parameter bei den Cuprizone-Tieren höher als bei den Kontrolltieren. Entsprechend sind die Mikrogliazellen in den untersuchten Cuprizone-Tieren größer, länger, verzweigter und besitzen dickere Fortsätze.
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

In der Neuron Summary wurden die Zell-Parameter Quantity of Extensions (Anzahl der Fortsätze), Length (Länge), Nodes (Verzweigungspunkte), Endings (Enden), Volume (Volumen) verglichen und jeweils höhere mittlere Werte bei den Cuprizone-Tieren beobachtet.

Daraus ergeben sich bei den Cuprizone-Tieren größere Mikrogliazellen mit einer höheren Anzahl an Fortsätzen. Diese sind im Durchschnitt länger, verzweigter und besitzen einen größeren Durchmesser (siehe Abb. 24).

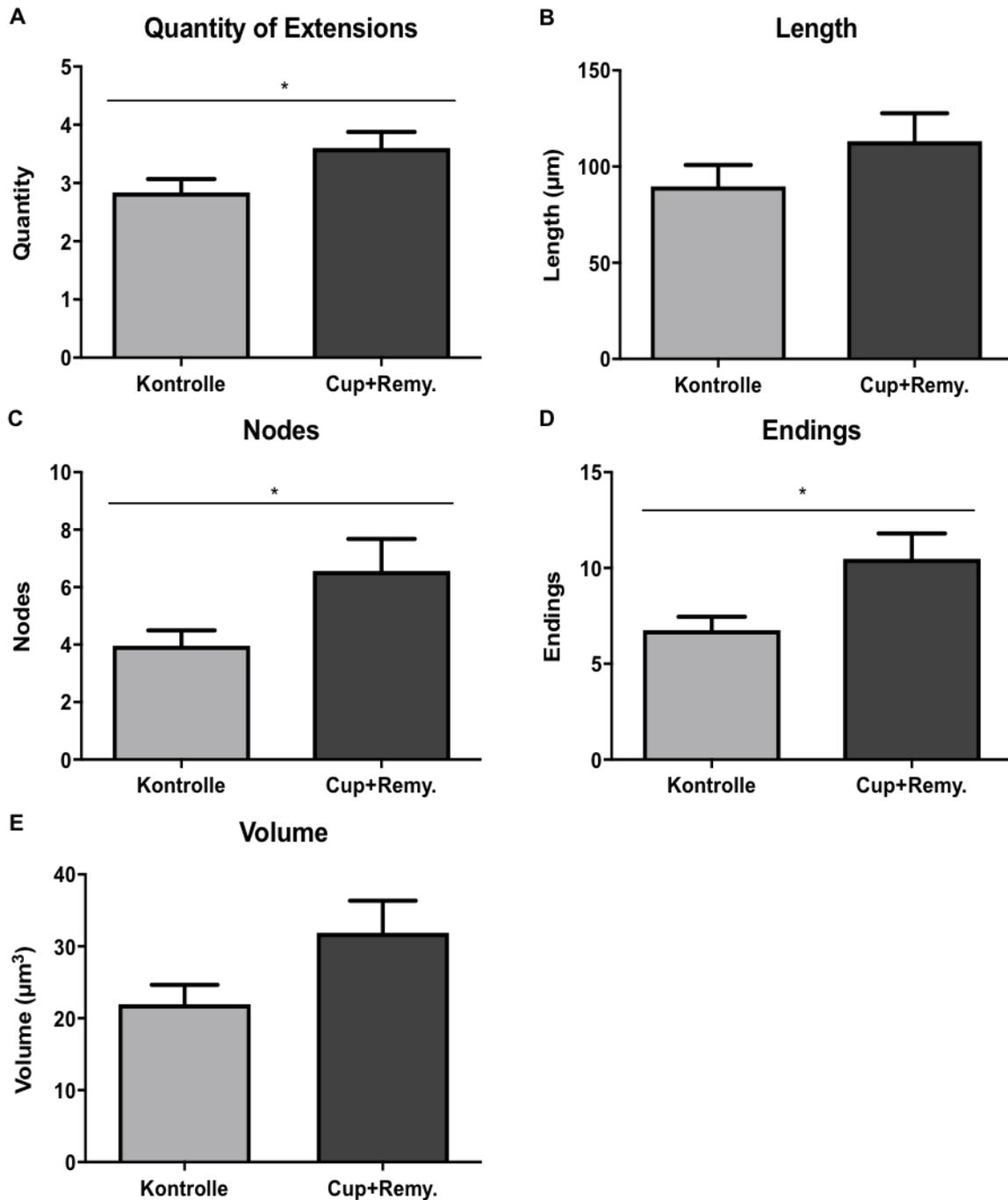


Abbildung 24: Ergebnisse Neuron Summary

Graphische Darstellung der Zell-Parameter **(A)** Quantity (Anzahl), **(B)** Length (Länge), **(C)** Nodes (Verzweigungspunkte), **(D)** Endings (Enden), **(E)** Volume (Volumen) von Kontroll- und Cuprizone-Tieren. Die Werte liegen bei den Cuprizone-Tieren jeweils höher als bei den Kontrolltieren. Die Mikrogliazellen bei den Cuprizone-Tieren besitzen somit durchschnittlich größere Zellen mit mehr Fortsätzen, die insgesamt länger und verzweigt sind als bei den Kontrolltieren.

* $p < 0.05$

Ergebnisse

Die Messung von Volumen und Oberfläche der durch die Fortsätze definierten Felder mittels Convex Hull 3D - Analyse ergab tendenziell höhere Werte für die Mikroglia von Cuprizone-Tieren.

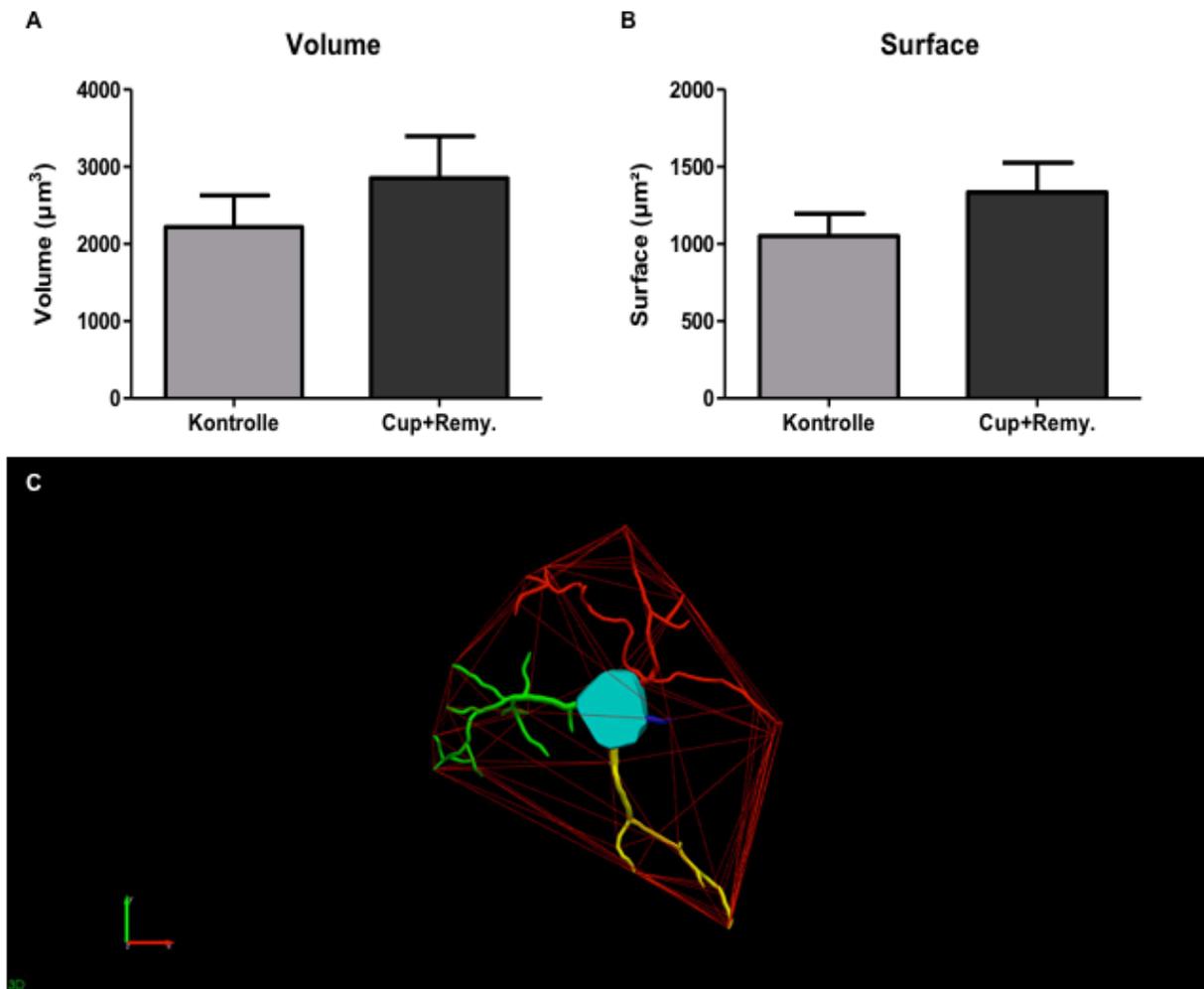


Abbildung 25: Ergebnisse Convex Hull 3D - Analyse

Graphische Darstellung der Parameter (A) Volume (Volumen) und (B) Surface (Oberfläche). (C) zeigt die Convex Hull 3D Analyse einer rekonstruierten Mikrogliazelle.

Die untersuchten Mikrogliazellen der Cuprizone-Tiere besitzen größere Fortsatzfelder als die der Kontrolltiere.

Ergebnisse

Der mittels Convex Hull 3D und Neuron Summary ermittelte Ramification Index (RI) als feiner Indikator für die Mikrogliaaktivität zeigte keinen Unterschied zwischen Cuprizone-Tieren und den Kontrollen.

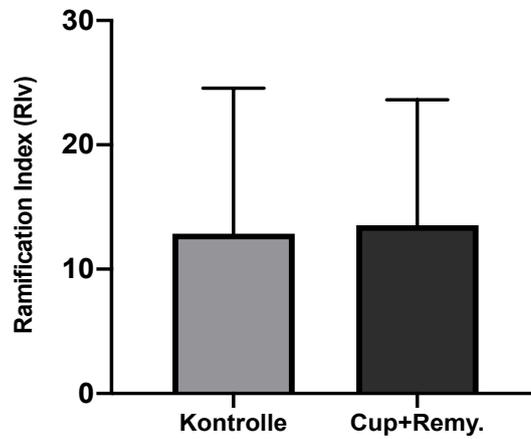


Abbildung 26: Ergebnisse Ramification Index (RI)

Die Analyse des Ramification Index (RI) mit vergleichbaren Werten zwischen Cuprizone- und Kontrolltieren. $RI = \text{maximales Projektionsvolumen (Vp)} / \text{Zellvolumen (Vc)}$.

4 Diskussion

4.1 Grenzen von MS-Tiermodellen

In den letzten Jahrzehnten wurden eine Reihe von Tiermodellen entwickelt um die Vielzahl an Aspekte der menschlichen MS zu verstehen. Die Notwendigkeit für Tierversuche ergibt sich aus den Limitierungen bei Humanstudien. Der Zugang zu menschlichem MS-Gewebe ist aufgrund gesetzlicher Regularien eingeschränkt, Biopsien werden selten durchgeführt und Proben aus Autopsien sind durch ein zum Untersuchungszeitpunkt meist chronisch ausgebranntes MS-Stadium verzerrt. Die Modifizierung der experimentellen Methodik während einer laufenden klinischen Studie und die Durchführung mechanistischer Studien, die sich mit den Pathomechanismen der Erkrankung befassen, sind bei Patienten nicht ohne weiteres möglich (Denic et al. 2011).

Allerdings können durch Tiermodelle nur Teilaspekte der pathologischen Vorgänge bei MS untersucht werden. Die Erfassung aller klinischen, pathologischen, radiologischen und genetischen Merkmale in einem einzigen Tiermodell ist aufgrund der Komplexität der Erkrankung nicht möglich (Lassmann & Bradl 2017, Procaccini et al. 2015).

Es existieren allerdings nützliche und relevante Tiermodelle um ausgewählte Aspekte der menschlichen Krankheit darzustellen. Abhängig von der spezifischen Forschungsfrage führt die rationale Auswahl eines geeigneten Tiermodells zu auf den Menschen übertragbaren Ergebnissen.

Die Auslösung der Erkrankung unterscheidet sich im Tiermodell allerdings stark von der menschlichen MS-Ätiologie. In Tiermodellen erfolgt die Induktion künstlich durch eine Immunisierung (EAE Modell) oder durch ein Toxin (Cuprizone-Modell). Bei der MS sind die auslösenden Faktoren dagegen deutlich komplexer (Baxter 2007; Torkildsen et al. 2008). Hieraus ergibt sich zusätzlich eine Differenz im zeitlichen Ablauf der Erkrankung zwischen Tiermodell und humaner MS-Erkrankung. Pathologische Prozesse, die bei MS-Patienten teilweise jahrelang unentdeckt vor der tatsächlichen klinischen Manifestation der Erkrankung beginnen werden bei der kurzfristigen Krankheits-Induktion im Tiermodell nicht berücksichtigt. Entsprechend erfolgt bei Therapiestudien die Behandlung bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung während beim Menschen in der Regel erst später mit einer Therapie begonnen wird. Noch wichtiger ist, dass die meisten experimentellen Studien Mäuse aus Inzuchtstämmen mit entsprechend genetischer Homogenität verwenden. Oft

Diskussion

haben diese Mäuse genetische Unregelmäßigkeiten akkumuliert, die in der menschlichen Bevölkerung nicht bestehen. Obwohl das Immunsystem von Nagetieren und Menschen tiefgreifende Unterschiede aufweist (da sie evolutionär weit entfernt sind), teilen sie einige wesentliche Prinzipien. In diesem Zusammenhang ermöglichen es Tiermodelle das Verständnis der relevanten Merkmale der menschlichen MS zu vertiefen. Die am häufigsten untersuchten Tiermodelle für MS sind die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) und toxininduzierte Demyelinisierungsmodelle, wie das Cuprizone-Modell (Procaccini et al. 2015). Das EAE-Modell dient der Erforschung immunvermittelter inflammatorischer Prozesse im ZNS (Kipp et al. 2017).

Das im Rahmen dieser Studie verwendete Cuprizone-Modell ermöglicht es verschiedene Aspekte der MS-Pathologie zu untersuchen. Insbesondere werden verschiedene Aspekte der progressiven MS-pathologischen Eigenschaften durch die Cuprizone-induzierte Pathologie gut zusammengefasst. Ähnlichkeiten zwischen dem Cuprizone-Modell und der progressiven MS-Pathologie sind Myelin- und Axonschäden, die funktionelle Aktivierung oxidativer Stresspfade (Draheim et al. 2016) und die relative Erhaltung der Blut-Hirn-Schranke.

Das Cuprizone-Modell in Kombination mit aktiver oder passiver EAE-Induktion (Cup-EAE-Modell) ermöglicht die Untersuchung sowohl immunvermittelter als auch nicht-immunvermittelte Aspekte der MS-Pathologie - ähnlich den „realen“ pathologischen Vorgängen - in einem Modell. Dies hat sich als wirksames Instrument erwiesen um die Relevanz von degenerativen Ereignissen im Gehirn für die Rekrutierung peripherer Immunzellen zu untersuchen (Scheld et al. 2016).

Kein existierendes Modell kann einem anderen gegenüber als überlegen angesehen werden. MS-Tiermodelle können sich aber gegenseitig ergänzen. Die spezifische Fragestellung der Studie ist entscheidend für die Auswahl des richtigen Tiermodells. Tiermodelle ermöglichen der MS-Forschung - trotz ihrer Einschränkungen - die Erkrankung mit ihrer komplexen Ätiologie besser zu verstehen. Das ideale Modell zur Untersuchung der Pathologie und therapeutischer Optionen gibt es bis dato nicht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu eruieren ob sich das ZNS an fokale Pathologien „erinnert“, die die neuronale Integrität langfristig beeinträchtigen. Um dies zu untersuchen haben wir eine klar definierte Pathologie (d.h. eine akute

Demyelinisierung) im Mäusehirn durch eine Cuprizone-Intoxikation induziert und die Mäuse sich über einen Zeitraum von 7 Monaten erholen lassen (Remyelinisierung).

4.2 Histopathologische Beobachtungen

Die histologische Aufarbeitung erfolgte repräsentativ an Paraffinschnitten aus den Regionen 160, 215 und 265 - entsprechend dem High Resolution Mouse Brain Atlas (Sidman et al.) - systematisch für jedes Versuchstier. Die Intoxikation mit Cuprizone führt zu einer reversiblen Demyelinisierung, zu Mikrogliazellaktivierung und Astrozytose (Norkute et al. 2009). Eine nahezu vollständige Demyelinisierung wird nach 5-6 Wochen Cuprizone-Intoxikation erreicht. Die anschließende Gabe von normalem Haltungsfutter führt zu einer spontanen endogenen Remyelinisierung (Kipp et al. 2009; Zendedel et al. 2013).

Nach einmaliger Demyelinisierung durch 5 wöchige Cuprizone-Intoxikation zeigten die Tiere in unserer Studie 7 Monate später in den untersuchten Regionen eine vollständige Remyelinisierung. Auch die Zahl der Oligodendrozyten erreichte in den Cuprizone-Tieren wieder ähnliche Werte wie in den Kontrolltieren.

Im Rahmen der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung werden Oligodendrozyten nach etwa 3-7 Tagen Cuprizone-Exposition apoptotisch (Mason et al. 2000; Komoly 2005; Hesse et al. 2010). Große Vakuolen, vergrößerte Mitochondrien und dichtes Kernchromatin wurden zu diesem Zeitpunkt in Oligodendrozyten elektronenmikroskopisch beobachtet (Komoly 2005). Die mRNA Expression von Myelinproteinen wie Proteolipid-Protein (PLP), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) und Myelin-Basisches-Protein (MBP) ist bereits nach einer Woche dramatisch herunterreguliert (Morell et al. 1998; Gudi et al. 2011). Zu Beginn scheinen Oligodendrozyten abhängig von Caspase-3 apoptotisch zu werden, während später eine Caspase-3-unabhängige Apoptose vorherrscht (Hesse et al. 2010; Veto et al. 2010). Stattdessen kann eine Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) beobachtet werden. In ähnlicher Weise wurde eine verstärkte PARP-Aktivierung und Induktion der Caspase-unabhängigen Apoptose auch für neurodegenerative MS-Muster mit primärer Oligodendroglieopathie beim Menschen beschrieben (Veto et al. 2010). Dabei muss bedacht werden, dass der Cuprizone-induzierte oligodendrogliale Zelltod mit nachfolgender Demyelinisierung ein künstliches Ereignis ist, das direkt oder indirekt durch das Toxin verursacht wird.

Nach 3-wöchiger Behandlung mit Cuprizone sind reife Oligodendrozyten fast vollständig verschwunden (Hesse et al. 2010; Skripuletz et al. 2011). Ab diesem Zeitpunkt kann eine fortschreitende Demyelinisierung im CC und im Kortex beobachtet werden (Hiremath et al. 1998; Morell et al. 1998). Die vollständige Demyelinisierung wird nach 5 bis 6 Wochen Cuprizone-Exposition erreicht (Hiremath et al. 1998; Matsushima und Morell 2001; Skripuletz et al. 2008; Gudi et al. 2009; Koutsoudaki et al. 2010). Die erfolgreiche Remyelinisierung umfasst mehrere Ereignisse, darunter Migration, Proliferation, terminale Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC, engl. oligodendrocyte progenitor cells) und Myelinisierung (Stangel und Hartung 2002). Diese Reparaturmechanismen setzen ein noch bevor eine Demyelinisierung immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Parallel zur Myelin-Clearance im CC (3-5 Wochen nach Cuprizone-Gabe) beginnen lokale und eingewanderte OPC innerhalb der Läsionen zu proliferieren (Mason et al. 2000; Gudi et al. 2009; Skripuletz et al. 2011). Anschließend (bis zu Woche 5) erfolgt die terminale Differenzierung der OPC und die Wiederherstellung der Myelinscheiden. Zahlreiche neu generierte reife Oligodendrozyten können ab Woche 5,5 (0,5 Wochen nach dem Ende der Cuprizone-Fütterung) im CC beobachtet werden (Koutsoudaki et al. 2010). Auf mRNA-Ebene kehrt MBP oder PLP zwischen Woche 5 und 6 auf normale Expressionsspiegel zurück (Morell et al. 1998; Gudi et al. 2011). Immunhistochemisch zeigt sich in anti-PLP-gefärbten Gewebeschnitten das Maximum der Demyelinisierung im CC in Woche 5 mit darauffolgender Remyelinisierung (Gudi et al. 2009). Die Remyelinisierung beginnt im Cuprizone-Modell direkt nach Abschluss der Demyelinisierung unabhängig davon ob Cuprizone weiter gefüttert wird oder nicht (Matsushima und Morell 2001; Hiremath et al. 2008; Gudi et al. 2009). Es scheint, dass im Falle einer fortgesetzten Fütterung mit Cuprizone bis Woche 6 neu gebildete Oligodendrozyten wieder geschädigt werden. In vitro werden insbesondere differenzierte Oligodendrozyten, nicht aber OPC durch Cuprizone beeinträchtigt (Benardais et al. 2013). Um die Remyelinisierung im CC zu untersuchen wird daher empfohlen Cuprizone über 5 Wochen zu verabreichen, um eine Störung der beginnenden Remyelinisierung durch Cuprizone auszuschließen.

Der Apoptose von Oligodendrozyten schliesst sich im Cuprizone-Modell eine Mikrogliose an. Aktivierte Mikroglia erscheinen bereits in den ersten 2 Wochen, noch bevor eine Demyelinisierung histologisch und immunhistochemisch nachgewiesen

werden kann (Hiremath et al. 1998). Nach 3 Wochen sind aktivierte Mikrogliazellen im CC, im Kortex und im Hippocampus zahlreich vorhanden. In den nächsten 2-3 Wochen beseitigen hoch aktivierte und proliferierende Mikrogliazellen die bei der Demyelinisierung entstandenen Myelintrümmer. Sobald die Demyelinisierung abgeschlossen ist sinkt die Zahl aktivierter Mikroglia wieder ab (Matsushima und Morell 2001; Skripuletz et al. 2011). Mikroglia sind hirnresidente mononukleäre Phagozyten, die von primitiven Makrophagen im embryonalen Dottersack stammen und zu Beginn der Vaskularisierung des ZNS (ab Tag 9,5 von Nagetierembryos) das Neuroepithel besiedeln (Harry und Kraft 2012; Ginhoux et al. 2013). Es handelt sich um aktive und dynamische Zellen, die sehr rasch auf Veränderungen im Mikroumfeld des ZNS reagieren können (Ransohoff und Perry 2009). Im Gehirn gesunder erwachsener Mäuse variiert die Morphologie der Mikroglia sowie deren Verteilung zwischen verschiedenen Hirnregionen (Lawson et al. 1990). Auch das Ausmaß der Mikroglia-Akkumulation während der durch Cuprizone induzierten Demyelinisierung ist nicht einheitlich. Vermutlich vor allem aufgrund des höheren Anteils an Myelin-Debris ist eine signifikant stärkere Mikrogliose in der weißen Substanz im Vergleich zu den Strukturen der grauen Substanz zu beobachten (Skripuletz et al. 2008; Gudi et al. 2009). Klassischerweise werden Mikroglia je nach ihrer Morphologie entweder als ruhende oder aktivierte Zellen klassifiziert (Benaroch 2013). Trotz ihrer Rolle als Wächterzellen des Gehirns sind ruhende Mikroglia entscheidend an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns und der Neuroprotektion beteiligt sowie eine wichtige Quelle verschiedener Wachstumsfaktoren (Jones und Lynch 2014; Olah et al. 2011). Grundsätzlich können aus dem Blut stammende Monozyten zu zwei verschiedenen Untergruppen peripherer Makrophagen mit den Phänotypen M1 und M2 differenzieren (Martinez et al. 2008; Cassetta et al. 2011). Das Konzept der M1/M2-Polarisation muss allerdings als eine Vereinfachung angesehen werden (Martinez und Gordon 2014). Während M1-Makrophagen an den Reaktionen der T-Helferzellen vom Typ 1 (TH-1) und an der Eliminierung von Mikroorganismen beteiligt sind, exprimieren aktivierte M2-Makrophagen entzündungshemmende Faktoren, phagozytieren Zelltrümmer und fördern die Gewebereparatur. Mikroglia können ebenfalls diesen pro-inflammatorischen oder anti-inflammatorischen/regenerativen Phänotyp annehmen. Diskutiert wird noch ob sie eine schädliche oder nützliche Rolle bei ZNS-Erkrankungen spielen (Block et al. 2007; Hanisch und Kettenmann 2007; Chhor et al. 2013). Es scheint, dass die

Mikroglia-Population im Cuprizone-Modell entweder heterogen aus den beiden Phänotypen M1 und M2 zusammengesetzt ist oder einen intermediären Phänotyp aufweist (Olah et al. 2012). Es kann keine Remyelinisierung stattfinden so lange Myelinrümpfer im Gewebe vorhanden sind. Die Phagozytose apoptotischer Zellen und Myelin-Debris durch Mikrogliazellen ist daher essentiell für eine effektive Remyelinisierung nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung, da der Sulfatidanteil im Myelin einen inhibierenden Effekt auf die Reifung der OPC hat (Kotter et al. 2006). Der Nachweis von Mikroglia erfolgte mittels anti-IBA1 Färbung. IBA1 wird in Mikroglia exprimiert und ist nach proinflammatorischer Stimulation zusätzlich erhöht (Ito et al. 1998). Histopathologisch zeigte sich in unserer Untersuchung in allen Regionen eine durchschnittlich erhöhte Dichte an Mikrogliazellen in den Cuprizone-Tieren. Da es sich bei unserem Versuch um eine Endpunktanalyse handelt ist allerdings unklar, ob die Mikrogliose im Verlauf neu aufgetreten ist oder sich nach reaktiver Erhöhung während der Cuprizone-Behandlung nie komplett zurückgebildet hat.

Aus Microarray-Analysen von Hirngeweben junger und alter Mäuse konnte gezeigt werden, dass im Alter vermehrt Gene exprimiert werden, die mit Entzündung und oxidativem Stress zusammenhängen (Prolla 2002). Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten sind Merkmale von Alterungsprozessen. Im Gehirn älterer Mäuse (20 - 24 Monate) besteht eine verstärkte Expression von unter anderem auf Mikroglia vorkommendem MHCII (engl. major histocompatibility complex II), sowie eine verstärkte Expression von GFAP, als charakteristisches Merkmal der Astrozyten (Godbout et al. 2005). Mikroglia akkumulieren aber auch in aktiven MS-Läsionen und spielen eine wichtige Rolle in allen Stadien der MS-Pathologie (O'Loughlin et al. 2018). Astrozyten erfüllen im adulten Gehirn eine Vielzahl von Funktionen einschließlich der Beteiligung an der synaptischen Übertragung, dem Energiestoffwechsel, der Regulierung der Neurogenese, der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke und der Kontrolle des zerebralen Blutflusses (Parpura et al. 2012). Eine starke Astrogliose mit Hypertrophie und Hyperplasie der Astrozyten tritt als Reaktion auf die Behandlung mit Cuprizone neben verschiedenen anderen Strukturen der weißen und grauen Substanz zum Beispiel im CC auf (Matsushima und Morell 2001; Gudi et al. 2009). Korrelierend mit dem Grad der Demyelinisierung steigt die Astrogliose während der akuten Demyelinisierung und erreicht ihren Höhepunkt um den Zeitpunkt der maximalen Demyelinisierung und der beginnenden Remyelinisierung etwa 5-6 Wochen nach der Cuprizone-Exposition (Hiremath et al.

1998; Gudi et al. 2009). Nach Beendigung der Cuprizone-Behandlung persistiert die Astroglie im Gegensatz zur lediglich transienten Mikrogliaaktivierung über einen Zeitraum von Wochen während der Remyelinisierungsperiode (Hibbits et al. 2012).

Wir stellten in unserer Studie eine erhöhte Astrozytendichte im medialen CC der Regionen 160 und 265 bei remyelinisierten Tieren im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollen zum Zeitpunkt von 7 Monaten nach der Cuprizone-Behandlung fest.

Bei altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer gilt die Astrozyten-Hypertrophie, die Akkumulation von GFAP-positiven Intermediärfilamenten und eine reaktive Astroglie mit Bildung einer Glianarbe als charakteristisch (Beach et al. 1989). Eine reaktive Glie kann aber in geringerem Maße auch in allen untersuchten Regionen des physiologisch alternden Gehirns nachgewiesen werden (Linnemann und Skarsfelt 1994).

Im ZNS von MS-Patienten exprimieren hypertrophe Astrozyten Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle, die mit der Rekrutierung von Mikroglia und Lymphozyten in das Parenchym in Verbindung gebracht werden können (Sorensen et al. 1999; Ponath et al. 2018). Die Astrozyten-vermittelte Rekrutierung von Mikroglia erweist sich für demyelinisierende Läsionen als positiv (Kipp et al. 2009): Die genetische Ablation von Astrozyten bei Mäusen, die mit Cuprizone behandelt wurden, verhinderte die Rekrutierung von Mikrogliazellen nach der Demyelinisierung, was zu einer verzögerten Entfernung von Myelintrümmern, einer beeinträchtigten Remyelinisierung und einer verminderten Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen führte. Daher sind aktivierte Astrozyten als Schlüsselregulatoren für die Remyelinisierung anzusehen (Skripuletz et al. 2013).

4.3 Mikrogliamorphologie

Um Veränderungen auf morphologischer Ebene zu untersuchen wurden in der vorliegenden Arbeit im Bereich der Region 265 Mikrogliazellen von Tieren der Kontroll- und Cuprizone-Gruppe mittels 3D-Rekonstruktion genauer analysiert.

Bekannt ist, dass Mikroglia auf akuten und chronischen Stress durch vor allem pro-inflammatorische Zytokine mit Änderungen ihrer Funktion und ihrer Morphologie reagieren. „Gestresste“ Mikroglia scheinen dabei eine erhöhte Anzahl an Fortsätzen mit komplexeren Verzweigungen zu besitzen (Walker et al. 2013).

Die während der Demyelinisierung durch Cuprizone anfallenden Myelin-Trümmer führen zu einer ausgeprägten Aktivierung von Mikroglia innerhalb des CC. Es muss aber von einem Form-Bias der Mikrogliazellen ausgegangen werden, da diese bei der Ausbreitung ihrer Fortsätze durch die Axon-Schichten blockiert werden. Die Rekonstruktion von Zellen der Schichten 5 und 6 des pScx stellt einen zufriedenstellenden Kompromiss dar, weil die Zellfortsätze sich frei ausbreiten können und während der Demyelinisierung trotzdem genügend Myelin-Debris für eine ausgeprägte Aktivierung von Mikroglia anfällt (Clarner et al. 2012). Im Rahmen dieser Untersuchung konnte bei den Curizone-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Formveränderung der Mikroglia beobachtet werden. In den Schichten 5 und 6 des pScx der Cuprizone-Tiere zeigten sich hypertrophierte Mikrogliazellen mit insgesamt längeren und verzweigteren Fortsätzen. Die Verteilung in der untersuchten Region war im Allgemeinen in beiden Gruppen gleichmäßig.

Bekannt ist, dass der Aktivierungsstatus von Mikroglia morphologisch erkennbar ist. Vier verschiedene morphologische Phänotypen, die klassischerweise mit unterschiedlichen Aktivierungszuständen assoziiert werden, können unterschieden werden: „ramified“ (verzweigt), „primed“ (vorbereitet), „reactive“ (reaktiv) und „amoeboid“ (amöbenartig) (Kettenmann et al. 2011; Stence et al. 2001; Soltys et al. 2001; Sheng et al. 1997; Kreutzberg 1996).

„Ramified“ (ruhende) Mikroglia sind durch kleine Zellkörper mit schlanken Fortsätzen charakterisiert. Im Vergleich zu diesem verzweigten Phänotyp weisen „primed“ Mikroglia einen breiteren Zellkörper auf. Das Verzweigungsmuster der Fortsätze unterscheidet sich aber nicht wesentlich von der „ramified“ Form. Dagegen weisen die reaktiven und amöboiden Phänotypen weniger Fortsätze und Verzweigungspunkte auf oder besitzen sogar keinerlei Fortsätze (Torres-Platas et al. 2014).

Verzweigte „ruhende“ Mikroglia sind aktiv an grundlegenden Aspekten der neuronalen Aktivität beteiligt, einschließlich der strukturellen und funktionellen Plastizität (Tremblay et al. 2010). Sie tasten ihre Umgebung ständig mit ihren Fortsätzen ab. So können sie auf etwaige pathologische Veränderungen, die sich aus einer Vielzahl von Faktoren wie Krankheitserregern (Garvey et al. 2013; Ding et al. 2013; Dellacasa-Lindberg et al. 2011), Stress (Sugama et al. 2012; Kopp et al. 2013) und Verletzungen ergeben (Morrison und Filosa 2013), mit einer Aktivierung reagieren. Wie hauptsächlich in Nagetierstudien zu ZNS-Verletzungen beschrieben,

geht es dabei um eine rasche Veränderung des Zellstoffwechsels und der Zellfunktion (Kettenmann et al. 2011; Graeber und Streit 2010; Stence et al. 2001), die auf morphologischer Ebene mit einer Umwandlung hochverzweigter Mikroglia in amöboide phagozytäre Mikroglia verbunden ist (Kettenmann et al. 2011; Stence et al. 2001; Soltys et al. 2001; Karperien et al. 2013). Nach der Zellaktivierung können die Fortsätze der verzweigten Mikroglia reversibel in den Zellkörper resorbiert werden. Vollständig aktivierte Mikroglia leiten dann ein lokomotorisches Stadium ein, in dem sie durch das Gewebe wandern (Stence et al. 2001; Hung et al. 2010). Mikroglia in aktiver Form können anschließend wieder in die „ruhende“ Form übergehen. Ramified Mikroglia können auch intermediäre Phänotypen erreichen, bevor sie zu einer verzweigten Morphologie zurückkehren, ohne jemals amöboidähnlich zu werden.

Im Allgemeinen waren alle ausgewerteten morphologischen Parameter in den Cuprizone-Tieren im Vergleich zu den Kontrollmäusen tendenziell erhöht. Der Ramification Index (RI), der durch die Convex Hull 3D-Analyse bestimmt wurde, war bei den Cuprizone-Tieren und altersgleichen Kontrollmäusen vergleichbar. Verzweigte, ruhende Mikrogliazellen haben eine große maximale Projektionsfläche (V_p) und eine relativ kleine Zellfläche (V_c). Im Gegensatz dazu sind bei aktivierten Mikrogliazellen oder Makrophagen die Zellfläche und die maximale Projektionsfläche nahezu identisch. Folglich nimmt eine aktivierte Mikrogliazelle einen RI-Wert nahe 1 an (Becker et al. 2018). Die Ergebnisse unserer Untersuchung deuten darauf hin, dass die Mikrogliazellen 7 Monate nach der Cuprizone-Behandlung eine intermediäre Morphologie zwischen den ruhenden Mikrogliazellen und den voll aktivierten Phagozyten aufweisen.

Mit zunehmendem Alter verändern sich Mikrogliazellen in ihrer Funktion und Morphologie eigentlich gegenteilig. Baron et al. zeigten eine Reduktion der Länge der Mikroglia-Fortsätze bei alten Mäusen (21 Monate) und damit eine geringere Abdeckung von Gewebenvolumen einer einzelnen Zelle. Darüber hinaus weisen gealterte Mikrogliazellen ein zunehmendes Soma-Volumen und eine abnehmende Komplexität bzw. Zirkularität des Verzweigungsmusters ihrer Fortsätze auf (Baron et al. 2014, Hefendehl et al. 2014).

5 Zusammenfassung

Es ist eine interessante Frage, ob sich das ZNS an fokale Pathologien „erinnert“, die die neuronale Integrität langfristig beeinträchtigen. Um dies zu untersuchen, haben wir in dieser Studie zunächst eine klar definierte Pathologie (d.h. eine akute Demyelinisierung) im Mäusegehirn durch eine Cuprizone-Intoxikation induziert und die Mäuse für weitere 7 Monate zur Wiederherstellung der normalen Körper/ZNS-Funktion mit normalem Haltungsfutter gefüttert. Obwohl die Myelindichte und die Anzahl der Oligodendrozyten unter Verwendung von Routinefärbungen im physiologischen, altersentsprechenden Bereich lagen blieben einige Pathologien auch nach dieser langen Periode der Remyelinisierung nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Induktion eines einmaligen intrinsischen Schadens durch Cuprizone (Demyelinisierung) auch nach erfolgter Remyelinisierung auf histologischer Ebene anhaltende Pathologien (Mikrogliaaktivierung, Astrozytose) zu beobachten sind. Auf morphologischer Ebene zeigte sich ein hypertropher Mikroglia-Phänotyp nach 7-monatiger Remyelinisierungsphase im Gegensatz zu einem ramifizierten Phänotyp mit kleinem Zellkörper und schlanken Fortsätzen bei den Kontrolltieren.

Zusammenfassend unterstreicht diese Studie, dass jede fokale Läsion während des Krankheitsverlaufs der MS hauptsächlich lang anhaltende Neuropathologien hervorrufen könnte. In den ersten Jahren könnten Kompensationsmechanismen wie die neuronale Plastizität die langsam fortschreitende neuronale Schädigung ausgleichen, was zu einer vollständigen Genesung im schubförmig-remittierenden Krankheitsstadium führen könnte. Nach einigen Jahren erreicht die neuronale Schädigung schließlich eine Schwelle und führt zu einem Krankheitsverlauf, der unabhängig von neuen, entzündlichen Läsionen der weißen oder grauen Substanz ist. Zukünftige Studien sind erforderlich, um die an diesem Prozess beteiligten Wege zu verstehen.

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Versuchsaufbau	18
Abbildung 2:	IHC nach der ABC-Methode.....	25
Abbildung 3:	Analysierte Gehirnregionen (Quelle: In Anlehnung an Allen Institut).....	30
Abbildung 4:	Übersichtsaufnahme mit eingezeichneter ROI.....	33
Abbildung 5:	ROI mit nummeriertem Grid	33
Abbildung 6:	Beispiel für Rekonstruktion.....	34
Abbildung 8:	Convex Hull 3D - Analyse	36
Abbildung 9:	Ramification Index (RI).....	37
Abbildung 10:	LFB - Färbung der Region 265 zur Darstellung von Myelin	38
Abbildung 11:	Graphische Darstellung des LFB/PAS - Scorings zum Myelinisierungsgrad bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone-Tieren in den Regionen 160, 215 und 265	39
Abbildung 12:	Immunhistochemische Färbung der Region 265 mit PLP zur Darstellung von Myelin	39
Abbildung 13:	Graphische Darstellung der PLP-Dichte im medialen und lateralen Corpus callosum bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone-Tieren in den Regionen 160, 215 und 265	41
Abbildung 14:	Immunhistochemische Färbung der Region 160 mit OLIG2 zur Darstellung von Oligodendrozyten	42
Abbildung 15:	Graphische Darstellung der Oligodendrozytenzahl im medialen und lateralen Corpus callosum bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone- Tieren in den Regionen 160, 215 und 265	43
Abbildung 16:	Immunhistochemische Färbung der Region 265 mit IBA1 zur Darstellung von Mikrogliazellen.....	45
Abbildung 17:	Graphische Darstellung der Mikroglia-dichte im medialen und lateralen Corpus callosum bei Kontrolltieren gegenüber Versuchstieren in den Regionen 160, 215 und 265	46
Abbildung 18:	Immunhistochemische Färbung der Region 265 mit GFAP zur Darstellung von Astrozyten	47
Abbildung 19:	Graphische Darstellung der Astrozytendichte im medialen und lateralen Corpus callosum bei Kontrolltieren gegenüber Cuprizone- Tieren in den Regionen 160, 215 und 265	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung der Region 265 mit CD3 zur Darstellung von T-Lymphozyten.....	49
Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von Mikroglia (Färbung IBA1)...	51
Abbildung 22: Rekonstruktion der Mikrogliazellen aus Abbildung 20 mittels Neurolucida 360	52
Abbildung 23: Ergebnisse Sholl-Analyse bei einem Radiuszuwachs (increment) von 10 μm	53
Abbildung 24: Ergebnisse Neuron Summary	55
Abbildung 25: Ergebnisse Convex Hull 3D - Analyse	56
Abbildung 26: Ergebnisse Ramification Index (RI).....	57

Tabellenverzeichnis

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Materialien/Chemikalien für Perfusion, Einbettung und Schnittherstellung	14
Tabelle 2:	Materialien/Chemikalien für Färbungen (LFB, IHC, Kerngegenfärbung)	15
Tabelle 3:	Paraffineinbettung	21
Tabelle 4:	Absteigende Alkoholreihe	22
Tabelle 5:	Aufsteigende Alkoholreihe	22
Tabelle 6:	Primärantikörper	26
Tabelle 7:	Sekundärantikörper	26
Tabelle 8:	IHC-Färbeprotokoll nach der ABC-Methode	28
Tabelle 9:	IHC-Färbeprotokoll nach der 2-Schritt-Methode	29

V Literaturverzeichnis

- Acs, P., Kipp, M., Norkute, A., Johann, S., Clarner, T., Braun, A., . . . Beyer, C. (2009). 17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia*, *57*(8), 807-814. doi:10.1002/glia.20806
- Allen Institute for Brain Science. Allen Brain Atlas API. Retrieved from: <https://mouse.brain-map.org/static/atlas>
- Bakker, D. A., & Ludwin, S. K. (1987). Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J Neurol Sci*, *78*(2), 125-137. doi:10.1016/0022-510x(87)90055-4
- Baron, R., Babcock, A. A., Nemirovsky, A., Finsen, B., & Monsonego, A. (2014). Accelerated microglial pathology is associated with Abeta plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, *13*(4), 584-595. doi:10.1111/ace.12210
- Baxter, A. G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*, *7*(11), 904-912. doi:10.1038/nri2190
- Beach, T. G., Walker, R., & McGeer, E. G. (1989). Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia*, *2*(6), 420-436. doi:10.1002/glia.440020605
- Becker, B., Demirbas, M., Johann, S., Zendedel, A., Beyer, C., Clusmann, H., . . . Kipp, M. (2018). Effect of Intrastratial 6-OHDA Lesions on Extrastriatal Brain Structures in the Mouse. *Mol Neurobiol*, *55*(5), 4240-4252. doi:10.1007/s12035-017-0637-9
- Benardais, K., Kotsiari, A., Skuljec, J., Koutsoudaki, P. N., Gudi, V., Singh, V., . . . Stangel, M. (2013). Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotox Res*, *24*(2), 244-250. doi:10.1007/s12640-013-9380-9
- Benarroch, E. E. (2013). Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*, *81*(12), 1079-1088. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a4a577
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., & Bruck, W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*, *123* (Pt 6), 1174-1183. doi:10.1093/brain/123.6.1174
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, *8*(1), 57-69. doi:10.1038/nrn2038
- Brück, W., Kuhlmann, T., & Stadelmann, C. (2003). Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, *206*(2), 181-185. doi:10.1016/s0022-510x(02)00191-0
- 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

- Carlton, W. W. (1967). Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci*, 6(1), 11-19. doi:10.1016/0024-3205(67)90356-6
- Cassetta, L., Cassol, E., & Poli, G. (2011). Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal*, 11, 2391-2402. doi:10.1100/2011/213962
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Ore, M. V., Celador, I. L., Josserand, J., . . . Fleiss, B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*, 32, 70-85. doi:10.1016/j.bbi.2013.02.005
- Clarner, T., Diederichs, F., Berger, K., Denecke, B., Gan, L., van der Valk, P., . . . Kipp, M. (2012). Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. *Glia*, 60(10), 1468-1480. doi:10.1002/glia.22367
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, 372(9648), 1502-1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7
- Dellacasa-Lindberg, I., Fuks, J. M., Arrighi, R. B., Lambert, H., Wallin, R. P., Chambers, B. J., & Barragan, A. (2011). Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*, 79(8), 3046-3052. doi:10.1128/IAI.01042-10
- Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18(1), 21-29. doi:10.1016/j.pathophys.2010.04.004
- Ding, T., Zhou, X., Kouadir, M., Shi, F., Yang, Y., Liu, J., . . . Zhao, D. (2013). Cellular prion protein participates in the regulation of inflammatory response and apoptosis in BV2 microglia during infection with *Mycobacterium bovis*. *J Mol Neurosci*, 51(1), 118-126. doi:10.1007/s12031-013-9962-2
- 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
- Franklin, R. J., & Ffrench-Constant, C. (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci*, 9(11), 839-855. doi:10.1038/nrn2480
- Garvey, L. J., Pavese, N., Politis, M., Ramlackhansingh, A., Brooks, D. J., Taylor-Robinson, S. D., & Winston, A. (2014). Increased microglia activation in neurologically asymptomatic HIV-infected patients receiving effective ART. *AIDS*, 28(1), 67-72. doi:10.1097/01.aids.0000432467.54003.f7
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*, 7, 45. doi:10.3389/fncel.2013.00045

- Godbout, J. P., Chen, J., Abraham, J., Richwine, A. F., Berg, B. M., Kelley, K. W., & Johnson, R. W. (2005). Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J*, *19*(10), 1329-1331. doi:10.1096/fj.05-3776fje
- Goldberg, J., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2015). Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice. *J Mol Neurosci*, *57*(2), 166-175. doi:10.1007/s12031-015-0595-5
- Graeber, M. B., & Streit, W. J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, *119*(1), 89-105. doi:10.1007/s00401-009-0622-0
- Groebe, A., Clarner, T., Baumgartner, W., Dang, J., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrogliosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum*, *8*(3), 163-174. doi:10.1007/s12311-009-0099-3
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci*, *8*, 73. doi:10.3389/fncel.2014.00073
- Gudi, V., Moharreggh-Khiabani, D., Skripuletz, T., Koutsoudaki, P. N., Kotsiari, A., Skuljec, J., . . . Stangel, M. (2009). Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Res*, *1283*, 127-138. doi:10.1016/j.brainres.2009.06.005
- Gudi, V., Skuljec, J., Yildiz, O., Frichert, K., Skripuletz, T., Moharreggh-Khiabani, D., . . . Stangel, M. (2011). Spatial and temporal profiles of growth factor expression during CNS demyelination reveal the dynamics of repair priming. *PLoS One*, *6*(7), e22623. doi:10.1371/journal.pone.0022623
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, *10*(11), 1387-1394. doi:10.1038/nn1997
- Harry, G. J., & Kraft, A. D. (2012). Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology*, *33*(2), 191-206. doi:10.1016/j.neuro.2012.01.012
- Hefendehl, J. K., Neher, J. J., Suhs, R. B., Kohsaka, S., Skodras, A., & Jucker, M. (2014). Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell*, *13*(1), 60-69. doi:10.1111/acel.12149
- Hesse, A., Wagner, M., Held, J., Bruck, W., Salinas-Riester, G., Hao, Z., . . . Kuhlmann, T. (2010). In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiol Dis*, *37*(2), 362-369. doi:10.1016/j.nbd.2009.10.016
- Hibbits, N., Yoshino, J., Le, T. Q., & Armstrong, R. C. (2012). Astroglialosis during acute and chronic cuprizone demyelination and implications for remyelination. *ASN Neuro*, *4*(6), 393-408. doi:10.1042/AN20120062

- Hiremath, M. M., Chen, V. S., Suzuki, K., Ting, J. P., & Matsushima, G. K. (2008). MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. *J Neuroimmunol*, *203*(1), 23-32. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.06.034
- 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. doi:10.1016/s0165-5728(98)00168-4
- Hung, J., Chansard, M., Ousman, S. S., Nguyen, M. D., & Colicos, M. A. (2010). Activation of microglia by neuronal activity: results from a new in vitro paradigm based on neuronal-silicon interfacing technology. *Brain Behav Immun*, *24*(1), 31-40. doi:10.1016/j.bbi.2009.06.150
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*, *57*(1), 1-9. doi:10.1016/s0169-328x(98)00040-0
- Jones, R. S., & Lynch, M. A. (2015). How dependent is synaptic plasticity on microglial phenotype? *Neuropharmacology*, *96*(Pt A), 3-10. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.08.012
- Kappos, L., Polman, C., Pozzilli, C., Thompson, A., Beckmann, K., Dahlke, F., & European Study Group in Interferon beta-1b in Secondary-Progressive, M. S. (2001). Final analysis of the European multicenter trial on IFNbeta-1b in secondary-progressive MS. *Neurology*, *57*(11), 1969-1975. doi:10.1212/wnl.57.11.1969
- Karperien, A., Ahammer, H., & Jelinek, H. F. (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci*, *7*, 3. doi:10.3389/fncel.2013.00003
- Keegan, B. M., & Noseworthy, J. H. (2002). Multiple sclerosis. *Annu Rev Med*, *53*, 285-302. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103909
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev*, *91*(2), 461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
- Kipp, M., & Baumgartner, W. (2011). "The cuprizone model and multiple sclerosis: disparities and similarities". (Dissertation), RWTH Aachen University. Retrieved from <http://publications.rwth-aachen.de/record/64260/files/3773.pdf>
- 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
- Kipp, M., van der Valk, P., & Amor, S. (2012). Pathology of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *11*(5), 506-517. doi:10.2174/187152712801661248

- Komoly, S. (2005). Experimental demyelination caused by primary oligodendrocyte dystrophy. Regional distribution of the lesions in the nervous system of mice [corrected]. *Ideggyogy Sz*, *58*(1-2), 40-43. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15884397>
- Kopp, B. L., Wick, D., & Herman, J. P. (2013). Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. *Physiol Behav*, *122*, 246-252. doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.030
- 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
- Koutsoudaki, P. N., Skripuletz, T., Gudi, V., Moharreggh-Khiabani, D., Hildebrandt, H., Trebst, C., & Stangel, M. (2009). Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neurosci Lett*, *451*(1), 83-88. doi:10.1016/j.neulet.2008.11.058
- Kremenutzky, M., Rice, G. P., Baskerville, J., Wingerchuk, D. M., & Ebers, G. C. (2006). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain*, *129*(Pt 3), 584-594. doi:10.1093/brain/awh721
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, *19*(8), 312-318. doi:10.1016/0166-2236(96)10049-7
- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., & Bruck, W. (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*, *125*(Pt 10), 2202-2212. doi:10.1093/brain/awf235
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, *133*(2), 223-244. doi:10.1007/s00401-016-1631-4
- Lassmann, H., Bruck, W., & Lucchinetti, C. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*, *7*(3), 115-121. doi:10.1016/s1471-4914(00)01909-2
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151-170. doi:10.1016/0306-4522(90)90229-w
- Leary, S. M., & Thompson, A. J. (2005). Primary progressive multiple sclerosis : current and future treatment options. *CNS Drugs*, *19*(5), 369-376. doi:10.2165/00023210-200519050-00001
- Lindner, M., Heine, S., Haastert, K., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., . . . Stangel, M. (2008). Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *34*(1), 105-114. doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00879.x

- Linnemann, D., & Skarsfelt, T. (1994). Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *Neurobiol Aging*, *15*(5), 651-655. doi:10.1016/0197-4580(94)00060-3
- Manrique-Hoyos, N., Jurgens, T., Gronborg, M., Kreutzfeldt, M., Schedensack, M., Kuhlmann, T., . . . Merkler, D. (2012). Late motor decline after accomplished remyelination: impact for progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*, *71*(2), 227-244. doi:10.1002/ana.22681
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, *6*, 13. doi:10.12703/P6-13
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, *13*, 453-461. doi:10.2741/2692
- Mason, J. L., Jones, J. J., Taniike, M., Morell, P., Suzuki, K., & Matsushima, G. K. (2000). Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination. *J Neurosci Res*, *61*(3), 251-262. doi:10.1002/1097-4547(20000801)61:3<251::AID-JNR3>3.0.CO;2-W
- Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*, *11*(1), 107-116. doi:10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x
- Miller, D. H., & Leary, S. M. (2007). Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, *6*(10), 903-912. doi:10.1016/S1474-4422(07)70243-0
- Morell, P., Barrett, C. V., Mason, J. L., Toews, A. D., Hostettler, J. D., Knapp, G. W., & Matsushima, G. K. (1998). Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci*, *12*(4-5), 220-227. doi:10.1006/mcne.1998.0715
- Morrison, H. W., & Filosa, J. A. (2013). A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation*, *10*, 4. doi:10.1186/1742-2094-10-4
- Norkute, A., Hieble, A., Braun, A., Johann, S., Clarner, T., Baumgartner, W., . . . Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces demyelination and astrogliosis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, *87*(6), 1343-1355. doi:10.1002/jnr.21946
- O'Loughlin, E., Madore, C., Lassmann, H., & Butovsky, O. (2018). Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *8*(2). doi:10.1101/cshperspect.a028993
- Olah, M., Amor, S., Brouwer, N., Vinet, J., Eggen, B., Biber, K., & Boddeke, H. W. (2012). Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia*, *60*(2), 306-321. doi:10.1002/glia.21266
- Olah, M., Biber, K., Vinet, J., & Boddeke, H. W. (2011). Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *10*(1), 108-118. doi:10.2174/187152711794488575

- Panitch, H., Miller, A., Paty, D., Weinshenker, B., & North American Study Group on Interferon beta-1b in Secondary Progressive, M. S. (2004). Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study. *Neurology*, *63*(10), 1788-1795. doi:10.1212/01.wnl.0000146958.77317.3e
- Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H., Schousboe, A., Haydon, P. G., . . . Verkhratsky, A. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*, *121*(1), 4-27. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x
- Ponath, G., Lincoln, M. R., Levine-Ritterman, M., Park, C., Dahlawi, S., Mubarak, M., . . . Pitt, D. (2018). Enhanced astrocyte responses are driven by a genetic risk allele associated with multiple sclerosis. *Nat Commun*, *9*(1), 5337. doi:10.1038/s41467-018-07785-8
- Pott, F., Gingele, S., Clarner, T., Dang, J., Baumgartner, W., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Res*, *1305*, 137-149. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.084
- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., & Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*, *47*, 485-505. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.10.004
- Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol*, *759*, 182-191. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.042
- Prolla, T. A. (2002). DNA microarray analysis of the aging brain. *Chem Senses*, *27*(3), 299-306. doi:10.1093/chemse/27.3.299
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, *27*, 119-145. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132528
- Scheld, M., Ruther, B. J., Grosse-Veldmann, R., Ohl, K., Tenbrock, K., Dreytmüller, D., . . . Kipp, M. (2016). Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci*, *36*(4), 1410-1415. doi:10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016
- Sheng, J. G., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (1997). Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms. *Acta Neuropathol*, *94*(1), 1-5. doi:10.1007/s004010050664
- Sidman, Kosaras, Misra, & Senft. (2017). High Resolution Mouse Brain Atlas. Retrieved from <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>
- Skipuletz, T., Hackstette, D., Bauer, K., Gudi, V., Pul, R., Voss, E., . . . Stangel, M. (2013). Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain*, *136*(Pt 1), 147-167. doi:10.1093/brain/aws262

- Skripuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., . . . Stangel, M. (2008). Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol*, *172*(4), 1053-1061. doi:10.2353/ajpath.2008.070850
- Skripuletz, T., Miller, E., Grote, L., Gudi, V., Pul, R., Voss, E., . . . Stangel, M. (2011). Lipopolysaccharide delays demyelination and promotes oligodendrocyte precursor proliferation in the central nervous system. *Brain Behav Immun*, *25*(8), 1592-1606. doi:10.1016/j.bbi.2011.05.009
- Soltys, Z., Ziaja, M., Pawlinski, R., Setkowicz, Z., & Janeczko, K. (2001). Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. *J Neurosci Res*, *63*(1), 90-97. doi:10.1002/1097-4547(20010101)63:1<90::AID-JNR11>3.0.CO;2-9
- Sorensen, T. L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V. A., . . . Ransohoff, R. M. (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*, *103*(6), 807-815. doi:10.1172/JCI5150
- Stangel, M., & Hartung, H. P. (2002). Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*, *68*(5), 361-376. doi:10.1016/s0301-0082(02)00105-3
- Stence, N., Waite, M., & Dailey, M. E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, *33*(3), 256-266. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241743>
- Sugama, S., Takenouchi, T., Fujita, M., Kitani, H., Conti, B., & Hashimoto, M. (2013). Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress. *Neuroscience*, *232*, 13-20. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.012
- Suzuki, K., & Kikkawa, Y. (1969). Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone). *Am J Pathol*, *54*(2), 307-325. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5765567>
- Taylor, L. C., Gilmore, W., & Matsushima, G. K. (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol*, *19*(3), 467-479. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00230.x
- Torkildsen, O., Brunborg, L. A., Myhr, K. M., & Bo, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl*, *188*, 72-76. doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x
- Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., . . . Mechawar, N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation*, *11*, 12. doi:10.1186/1742-2094-11-12
- Tremblay, M. E., Lowery, R. L., & Majewska, A. K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*, *8*(11), e1000527. doi:10.1371/journal.pbio.1000527

- Veto, S., Acs, P., Bauer, J., Lassmann, H., Berente, Z., Setalo, G., Jr., . . . Illes, Z. (2010). Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death. *Brain*, *133*(Pt 3), 822-834. doi:10.1093/brain/awp337
- Vukusic, S., & Confavreux, C. (2007). Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol*, *20*(3), 269-274. doi:10.1097/WCO.0b013e32812583ad
- Walker, F. R., Nilsson, M., & Jones, K. (2013). Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets*, *14*(11), 1262-1276. doi:10.2174/13894501113149990208
- York, E. M., LeDue, J. M., Bernier, L. P., & MacVicar, B. A. (2018). 3DMorph Automatic Analysis of Microglial Morphology in Three Dimensions from Ex Vivo and In Vivo Imaging. *eNeuro*, *5*(6). doi:10.1523/ENEURO.0266-18.2018
- Zendedel, A., Beyer, C., & Kipp, M. (2013). Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection. *J Mol Neurosci*, *51*(2), 567-572. doi:10.1007/s12031-013-0026-4

VI Eidesstattliche Versicherung

Fegg, Florian Nepomuk

Name, Vorname(n)

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

„Langfristige Effekte der Demyelinisierung im Cuprizone Modell“

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

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

München, den 07.01.2022

Ort, Datum

Florian Nepomuk Fegg

Unterschrift Doktorand

VII Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ. Prof. Dr. med. Christoph Schmitz für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit an seinem Lehrstuhl, die Bereitstellung von Arbeitsmitteln sowie die Unterstützung durch alle Mitarbeiter.

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit von seinem Wissen und „know-how“ zu profitieren. Außerdem möchte ich mich für die freundschaftlichen und konstruktiven Hilfestellungen, die stetige Motivation sowie das Engagement beim Erstellen dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Tanja Hochstrasser für die hervorragende Unterstützung bei dieser Promotionsarbeit, die kompetente Hilfe bei der Durchführung der Versuche und bei der statistischen Auswertung sowie die Erstkorrektur meiner Niederschrift. Sie hatte stets ein offenes Ohr für Fragen und investierte viel Mühe in die Betreuung der Arbeit.

Ebenso danke ich allen technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls Anatomie II - Neuroanatomie der LMU München, vor allem Frau Beate Aschauer, Frau Astrid Baltruschat, Frau Sabine Tost und Frau Barbara Mosler. Ohne ihre tatkräftige Unterstützung sowie die guten Ratschläge bei der praktischen Durchführung der Färbungen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meiner Mitdotorandin Frau Sophie Hanusch danke ich für die praktische Vorarbeit bei der Etablierung der Mikroglia-rekonstruktion und die Hilfestellungen bei den ersten Rekonstruktionsversuchen.

Mein tief empfundener Dank geht an meine Eltern, die mir stets zur Seite standen und mich immer unterstützt haben. Für die Ermöglichung meines beruflichen Werdegangs - Danke!