

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der anatomischen
Anstalt

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Christoph Schmitz

**Veränderungen der Kortexdicke und
Neuronendichte im Multiple Sklerose Cuprizonen-
Modell**

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

vorgelegt von
Caroline Roggenkamp
aus Ahaus

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Markus Kipp

Mitberichterstatter: Dr. Annelie Peters
PD Dr. Astrid Blaschek

Mitbetreuung durch die
promovierte Betreuerin: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Klinische Verlaufsformen der MS und deren histopathologische Grundlagen	1
1.1.2 Medikamentöse Therapie	2
1.2 Das Cuprizon-Modell	2
1.3 „Design-based“ Stereologie	3
1.3.1 Prinzip der systematischen und zufälligen Probennahme	3
1.3.2 Herausforderung in der Quantifizierung von Zellen	5
1.3.2.1 Größe und Lage der Zellen	5
1.3.2.2 Atrophie des Gewebes	7
1.3.3 Regeln für die Quantifizierung der Zellen.....	7
1.3.3.1 Zählkriterium	7
1.3.3.2 Ein- und Ausschlusslinien.....	8
1.3.4 Qualitätssicherung der stereologischen Untersuchung sowie der immunhistochemischen Färbung.....	9
1.3.5 Berechnung der Gesamtzellzahl	10
1.4 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Versuchsgruppe	13
2.2 Verwendete Chemikalien und Materialien.....	14
2.3 Versuchsdurchführung	17
2.4 Transkardiale Perfusion und Materialgewinnung	17
2.5 Kryoprotektion und Anfertigung von Kryoschnitten	18
2.6 Paraffineinbettung	20
2.7 Histologische Aufbereitung der Schnitte	21

2.7.1	Beschichtung der Objektträger mit 0,5 %-iger Gelatine	21
2.7.2	Immunhistochemie	21
2.7.2.1	Immunhistochemische Färbung der kryoeingebetteten Schnitte	22
2.7.2.2	Immunhistochemische Färbung der paraffineingebetteten Schnitte.....	24
2.8	Erhebung der Daten.....	27
2.8.1	Bestimmung der Kortexdicke	27
2.8.2	Stereologische Überprüfung der anti-NeuN-Färbung	28
2.8.3	Parameter der „design-based“ Stereologie	28
2.8.4	Bestimmung der Dichte NeuN ⁺ - Zellen im sensiblen Kortex	30
2.8.5	Statistische Auswertung	31
3.	Ergebnisse	33
3.1	Validierung des Cuprizone-Modells	33
3.1.1	Cuprizone-Intoxikation führt zu Demyelinisierung	33
3.1.2	Cuprizone-Intoxikation führt zu Mikrogliazellaktivierung	34
3.2	Validierung der stereologischen Auswertung	35
3.3	Ergebnisse der stereologischen Auswertung.....	37
3.3.1	Cuprizone-Intoxikation führt zu selektiver Kortexatrophie	37
3.3.2	Cuprizone-Intoxikation führt zu keiner signifikanten Veränderung der Neuronendichte	43
4.	Diskussion	45
4.1	Kortikale Atrophie als Surrogatmarker für den Krankheitsprogress	48
4.2	Neuronenverlust im Cuprizone-Modell	49
4.3	Limitationen von Tiermodellen.....	50
4.4	Antiinflammatorische und neuroprotektive Medikamente	51
5.	Zusammenfassung	53
	Quellen	54
	Abbildungsverzeichnis	58
	Tabellenverzeichnis.....	60

Danksagung.....	61
Eidesstattliche Erklärung.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb Abbildung
ABC Avidin-Biotin-Komplex
ANOVA analysis of variance
asf area sampling fraction
DAB Diaminobenzidin, Diaminobenzidin
EAE Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
IBA1 ionized calcium binding adaptor molecule 1
IgG Immunglobulin G
MS Multiple Sklerose
NeuN Neuronal Nuclei
PBS Phosphate-buffered saline
PFA Paraformaldehyd
PLP Proteo-Lipo-Protein
ROI Region of Interest
RT Raumtemperatur
SEM standart error of the mean
SRS systematic and random sampling
ssf section sampling fraction
Tab Tabelle
tsf thickness sampling fraction
UVCS unbiased virtuell counting space
ZNS Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-inflammatorische demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die genaue Pathogenese der MS ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Lange Zeit galt die MS als eine rein autoimmune Erkrankung des ZNS. Nach heutigem Wissensstand liegt der MS aber eine multifaktorielle Genese zugrunde (Lucchinetti et al. 2000). Es zeigte sich, dass neben der autoimmunen Komponente auch neurodegenerative Prozesse an der Genese und Progredienz beteiligt sind (Trapp and Nave 2008; Hauser and Oksenberg 2006).

1.1.1 Klinische Verlaufsformen der MS und deren histopathologische Grundlagen

Klinisch lassen sich bei der MS verschiedene Verlaufsformen unterscheiden. Die Mehrheit der Patienten (85-90 %) leidet an einer schubförmigen Form (Miller and Leary 2007). Diese ist durch wiederholt auftretende, abgrenzbare Schübe charakterisiert. Die zugrunde liegende Pathologie der Schübe scheint eine Inflammation zu sein (Wagenknecht et al. 2016; Thompson et al. 2018), hervorgerufen durch periphere Immunzellen. Es entstehen Läsionen im ZNS, die gekennzeichnet sind durch Demyelinisierung, Oligodendrozytenapoptose (Barnett and Prineas 2004) und einem Verlust der Axone (Trapp et al. 1998). Zunächst war man der Ansicht, dass sich die Läsionen nur in der weißen Substanz des ZNS bilden. Die Arbeitsgruppe um Brownell und Hughes konnte jedoch zeigen, dass sich rund ein Drittel aller Läsionen außerhalb der weißen Substanz befinden (Brownell and Hughes 1962). Hiervon liegen 5 % im Kortex. Andere Studien zeigten, dass MS-Läsionen auch in subkortikalen Bereichen wie dem Thalamus (Cifelli et al. 2002), dem Nucleus caudatus (Bermel et al. 2003) oder dem Rückenmark (Gilmore et al. 2006) zu finden sind. Klinisch äußert sich ein Schub in einer akuten neurologischen Verschlechterung, je nach Lokalisation einer neuen Läsion. Ein Schub kann wenige Wochen bis Monate andauern und bildet sich dann entweder vollständig oder teilweise zurück (Lublin and Reingold 1996).

Bei einem Großteil der Patienten geht die schubförmige MS in einen sekundär chronisch progredienten Verlauf über. Dieser ist charakterisiert durch eine stetige Zunahme der klinischen Symptomatik, ohne klar abgrenzbare Schübe (Lublin and Reingold 1996). Histopathologisch zeigt sich eine chronische Demyelinisierung und ein axonaler Schaden. Eine simultane

Inflammation wie bei akuten Läsionen findet nicht statt (Prineas et al. 2001). MRT-Studien zeigen bei Progredienz der Erkrankung eine zerebrale Atrophie (Losseff et al. 1996). Sie scheint ein wichtiger Faktor für die zunehmende klinische Symptomatik zu sein (Fisher et al. 2008). Die Ursache der Atrophie ist noch unklar. Eine inflammatorisch unabhängige Neurodegeneration ist ein Erklärungsansatz für die Atrophie (Peterson et al. 2001; Frischer et al. 2009; Raine and Cross 1989).

1.1.2 Medikamentöse Therapie

Die MS-Therapie ist weitestgehend auf antiinflammatorische und immunmodulatorische Medikamente ausgerichtet, da die MS lange als eine rein autoimmunvermittelte Erkrankung galt. Diese Medikamente sind gut wirksam, um die Schubfrequenz zu verringern (Jacobs et al. 1981) sowie die Dauer eines Schubes zu verkürzen. Studien zeigten jedoch, dass die Schubfrequenz für die Progredienz irrelevant ist (Confavreux et al. 2000). Der Übergang in die sekundär chronisch progrediente Form kann mit diesen Medikamenten häufig nicht verhindert werden. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass nicht inflammatorische, sondern neurodegenerative Prozesse für das Voranschreiten der Erkrankung entscheidend sind.

1.2 Das Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Modell ist ein Mausmodell, das der Erforschung der Pathogenese der MS dient. Es ist ein primär neurodegeneratives Modell ohne Beteiligung von Immunzellen (Hiremath et al. 2008).

Beim Cuprizone-Modell werden Mäuse mit dem Kupfer-Chelator Cuprizone intoxikiert. Die genaue Funktionsweise von Cuprizone ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass Cuprizone eine Inhibition der Atmungskette bedingt und somit zu oxidativem Stress führt (Draheim et al. 2016). Durch Cuprizone wird eine gut reproduzierbare Demyelinisierung (Blakemore 1972) durch Oligodendrozytenapoptose hervorgerufen. Während sich eine erste Oligodendrozytenapoptose schon nach wenigen Tagen zeigt (Buschmann et al. 2012), ist eine vollständige Demyelinisierung nach Intoxikation über einen Zeitraum von vier bis fünf Wochen sichtbar (Blakemore 1972; Carlton 1966). Es folgt eine Mikroglia- und Astrozytenaktivierung sowie akuter axonaler Schaden (Kipp et al. 2017; Irvine and Blakemore 2006). Die akut-demyelinisierten Läsionen sind im Corpus callosum sowie in kortikalen (Goldberg et al. 2015) und subkortikalen Strukturen (Wagenknecht et al. 2016) nachweisbar. Die histologischen Prozesse manifestieren sich im Corpus callosum in höherem Ausmaß als in den kortikalen und

subkortikalen Strukturen (Buschmann et al. 2012). Die Studie von Buschmann et al (2012) zeigt, dass die basale Chemokinekonzentration im Corpus callosum deutlich höher ist als im Kortex. Die Cuprizone-Intoxikation bedingt aber einen gleichmäßigen Anstieg der Chemokinekonzentration in beiden Regionen.

Die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung beeinflusst auch die Neurone. Es konnte gezeigt werden, dass neuronale Dendriten im somatosensiblen Kortex nach Cuprizone-Intoxikation eine geringere Länge aufweisen als vorher (Hamada and Kole 2015).

Nach Beendigung der Cuprizone-Intoxikation beginnt der Prozess der Remyelinisierung (Morell et al. 1998). Bereits zwei Wochen nach Cuprizone-Intoxikation sind 22 % der vormals demyelinisierten Axone wieder remyelinisiert (Blakemore 1973). Nach sechs Wochen sind nahezu alle Axone remyelinisiert.

Insgesamt weist das Cuprizone-Modell deutliche Parallelen zu den histopathologischen Merkmalen einer akuten MS-Läsion auf. Ein bedeutender Unterschied ist jedoch, dass im Cuprizone-Modell die Veränderungen unabhängig von peripheren Immunzellen stattfinden und keine T-Zellen beteiligt sind (Hiremath et al. 2008).

1.3 „Design-based“ Stereologie

Die „design-based“ Stereologie ist eine effiziente Methode zur Quantifizierung ausgewählter Strukturen, zum Beispiel von Zellen innerhalb eines Gewebes. Sie gilt heutzutage als hochmodern (*engl. „state-of-the-art“*), und bietet viele Vorteile im Vergleich zu herkömmlichen Methoden. Die „design-based“ Stereologie ermöglicht quantitative Analysen unabhängig der Lage und Größe von Strukturen sowie vom Volumen des Gewebes. Solche Analysen sind maßgebend, um Aussagen über eine Differenz zwischen zwei Vergleichsgruppen treffen zu können. Sie basiert auf dem Prinzip der Nutzung eines dreidimensionalen Raums („optical disector“), in dem die Zellen gezählt werden, in Kombination mit dem Prinzip der systematischen und zufälligen Probennahme (*engl. systematic and random sampling* (SRS-Prinzip), „optical fractionator“).

1.3.1 Prinzip der systematischen und zufälligen Probennahme

Das SRS-Prinzip ermöglicht, große Gewebe (*engl. region of interest* (ROI)) mit einem akzeptablen Arbeitsaufwand zu untersuchen und ein präzises Ergebnis zu erzielen (Gundersen and Jensen 1987). Es werden einzelne Stichproben der ROI ausgezählt und dann eine

Gesamtzahl geschätzt. Dabei muss jede Zelle des Gewebes die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, gezählt zu werden. Hierfür wird die ROI in gleichdicke Schnitte und dann in Schnittserien eingeteilt (Abbildung (Abb.) 1). Für die weiteren Untersuchungen wird eine Schnittserie ausgewählt. Der Abstand der Schnitte zueinander ist systematisch (jeder dritte Schnitt), die Auswahl der Schnittserie (Schnittserie 1, 2 oder 3) ist zufällig (Gundersen 1986).

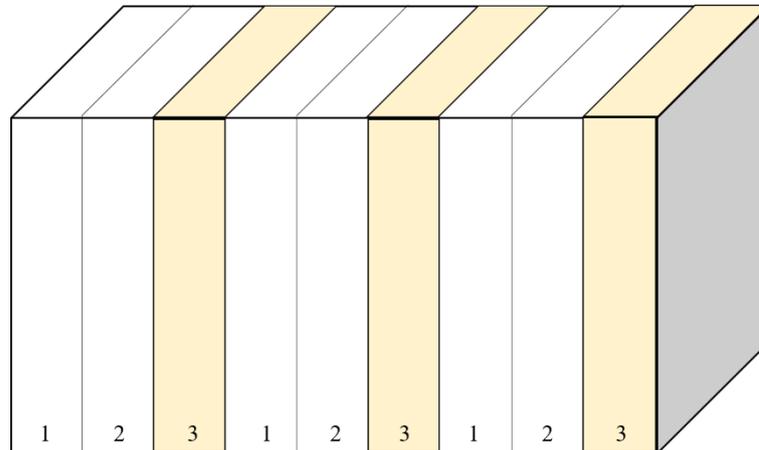


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer ROI. Die ROI wurde in gleichdicke Schnitte und in drei Schnittserien eingeteilt. Die dritte Schnittserie (gelb) wurde zufällig ausgewählt.

Über die ausgewählten Schnitte wird zufällig, aber systematisch, ein Gitter mit einer definierten Kantenlänge in xy-Richtung gelegt (Abb. 2, blaues Gitter). In diesem Gitter werden kleinerer Zählrahmen (*engl. unbiased counting frame*) (Schmitz and Hof 2000) generiert. Die Zählrahmen besitzen ebenfalls eine definierte Kantenlänge und werden abermals zufällig, aber systematisch platziert (Abb. 2, grüne Kästen). Jede Zelle hat somit die gleiche Wahrscheinlichkeit, innerhalb des Zählrahmens zu liegen.

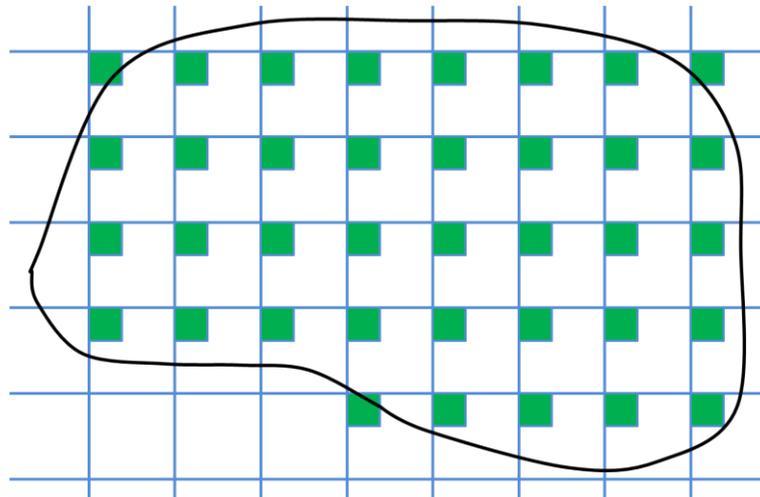


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Zählbereiches eines Schnittes. Über den Zählbereich eines Schnittes (schwarzer Umriss) wird ein Gitter mit definierter Kantenlänge gelegt (blau). In die Gitterquadrate werden wiederum Zählrahmen mit definierter Kantenlänge gelegt (grün). Der Abstand zwischen den Zählrahmen ist somit systematisch, während die Lage des Gitters zufällig gewählt ist.

Der Zählrahmen wird in die z-Richtung erweitert, sodass ein dreidimensionaler Raum entsteht (engl. *unbiased virtually counting space* (UVCS)). Die Länge der z-Achse muss kleiner sein als die Dicke des Schnitts, damit der UVCS innerhalb des Schnitts liegt. In diesem UVCS werden die Zellen gezählt.

Insgesamt wird das SRS Prinzip somit dreimal angewandt. Im Vergleich dazu könnten bei den herkömmlichen Methoden durch eine manuelle Auswahl der Schnitte welche bevorzugt werden, die beispielsweise aufgrund einer geringeren Zelldichte leichter auszuwerten wären. Da die Dichte im Gewebe jedoch variieren kann, läge keine repräsentative Stichprobe vor und somit möglicherweise ein verfälschtes Ergebnis. Die „design-based“ Stereologie mit dem SRS-Prinzip bietet damit enorme Vorteile, um repräsentative und unverfälschte Analysen sicherzustellen.

1.3.2 Herausforderung in der Quantifizierung von Zellen

Die Herausforderung in der Quantifizierung der Zellen liegt darin, dass keine Zelle zweimal gezählt wird. Im Folgendem wird dies näher erläutert.

1.3.2.1 Größe und Lage der Zellen

Die Größe der einzelnen Zelle beeinflusst die Wahrscheinlichkeit dieser Zelle im ausgewählten Schnitt zu sein und somit gezählt zu werden (Mayhew 1991). Größere Zellen haben eine höhere Wahrscheinlichkeit mehrfach angeschnitten zu sein und dadurch in unterschiedlichen Schnitten

gezählt zu werden (Abb. 3). Würden alle Zellen in jedem Schnitt gezählt werden, erhielte man trotz gleicher Anzahl an Zellen unterschiedliche Ergebnisse (A: 9 Zellen, B: 5 Zellen).

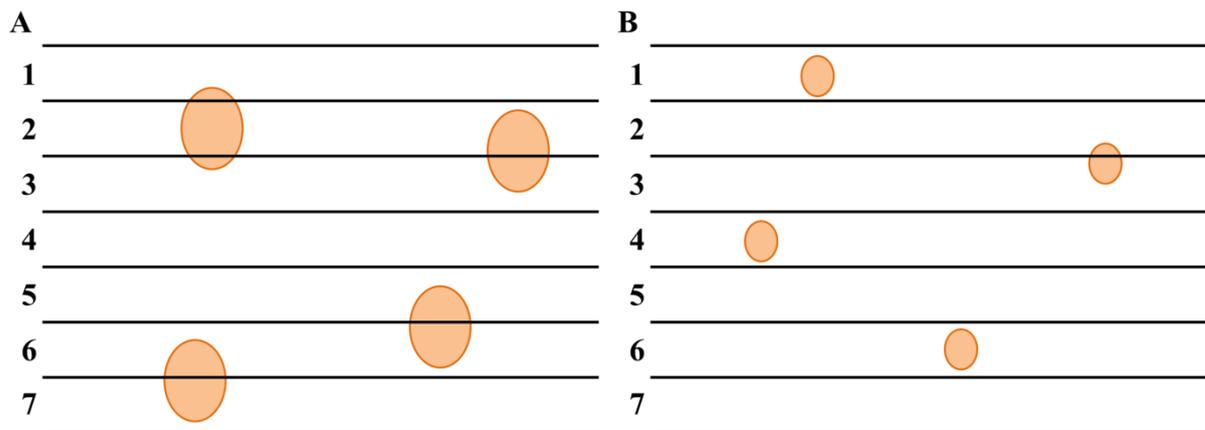


Abbildung 3: Gegenüberstellung zweier Gewebe mit unterschiedlich großen Zellen (schematische Darstellung). Die Abbildungen A und B zeigen beispielhaft jeweils ein Gewebe unterteilt in sieben Gewebeschnitte. In beiden Abbildungen sind jeweils vier Zellen (orange) dargestellt. In Abbildung A sind die Zellen größer und somit auf mehreren Schnitten. In Abbildung B sind die Zellen kleiner dargestellt und nur eine Zelle auf zwei Schnitten angeschnitten.

Ebenso verhält es sich mit Zellen, die unterschiedlich im Raum liegen. Wird eine längliche Zelle transversal angeschnitten, hat diese Zelle eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit in mehreren Schnitten gezählt zu werden, als eine longitudinal angeschnittene Zelle (Abb. 4) (Schmitz and Hof 2005). Würde man auch hier jeden Schnitt auszählen, erhielte man wiederum trotz gleicher Zellanzahl unterschiedliche Ergebnisse (A: 15 Zellen, B: 5 Zellen).

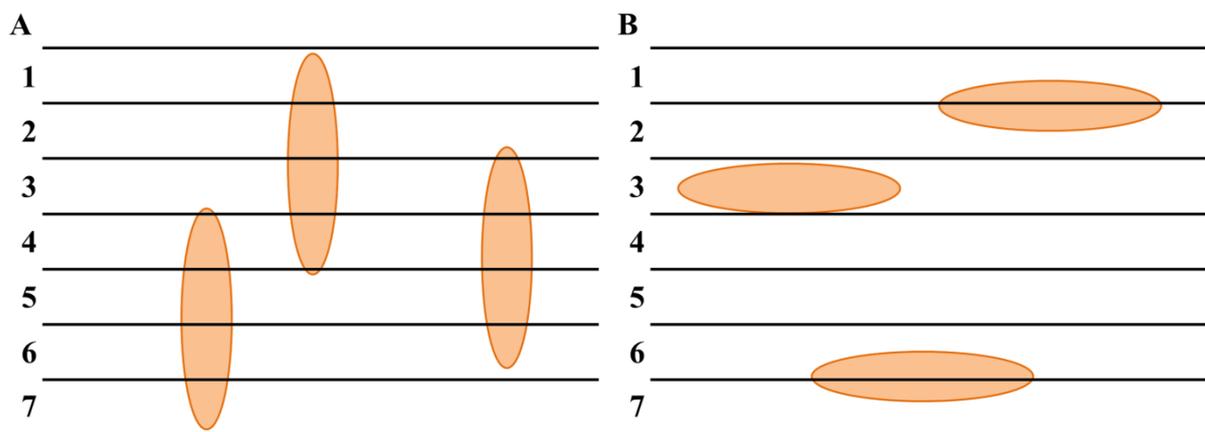


Abbildung 4: Gegenüberstellung zweier Gewebe mit unterschiedlich ausgerichteten Zellen (schematische Darstellung). Die Abbildungen A und B zeigen beispielhaft jeweils ein Gewebe unterteilt in sieben Gewebeschnitte. In beiden Abbildungen sind insgesamt drei Zellen (orange) dargestellt. In Abbildung A sind die Zellen längs angeordnet, und auf mehreren Schnitten angeschnitten. In Abbildung B sind die Zellen quer dargestellt. Zwei Zellen sind jeweils auf zwei Schnitten angeschnitten.

1.3.2.2 Atrophie des Gewebes

Das Volumen des Gewebes stellt eine weitere Herausforderung dar. Beispielsweise erhöht sich die Dichte der Zellen mit zunehmender Atrophie in der Versuchsgruppe (Puelles et al. 2014). Die Wahrscheinlichkeit steigt, dass eine Zelle im Vergleich zur Kontrollgruppe gezählt wird (Abb. 5). Auch hier würde man bei einer Auszählung der Zellen auf allen Schnitten trotz gleicher Anzahl an Zellen ein unterschiedliches Ergebnis erhalten (A: 10 Zellen, B: 13 Zellen).

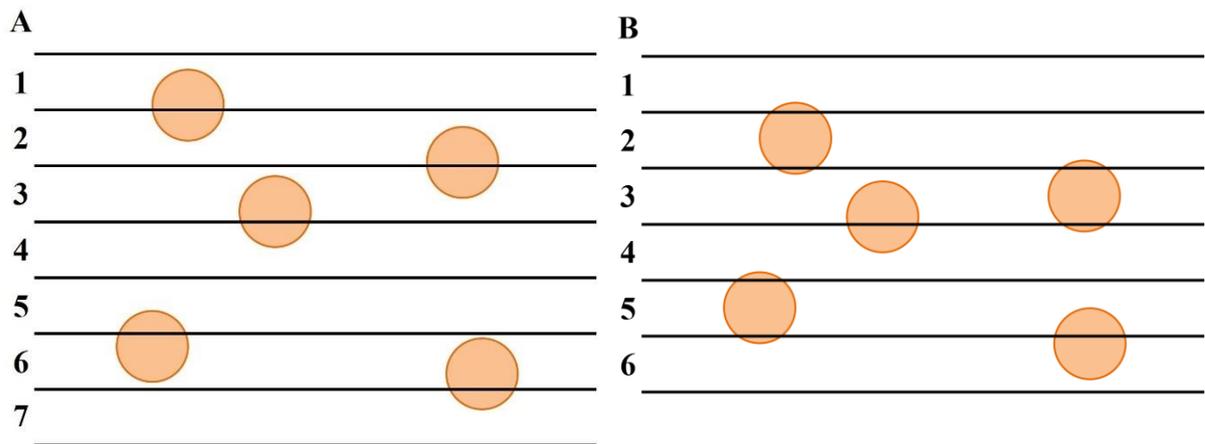


Abbildung 5: Gegenüberstellung zweier Gewebe mit unterschiedlichem Volumen (schematische Darstellung). Die Abbildung A zeigt Kontrollgewebe, Abbildung B zeigt atrophiertes Gewebe. In beiden Abbildungen sind insgesamt fünf Zellen (orange) dargestellt. Da in Abbildung B das Gewebe ein geringeres Volumen hat, erhöht sich die Zelldichte. Hierdurch haben die Zellen eine höhere Wahrscheinlichkeit gezählt zu werden.

1.3.3 Regeln für die Quantifizierung der Zellen

Würde eine Zelle, die auf mehreren Schnitten zu sehen ist, auch mehrfach gezählt werden, käme es zu verfälschten Hochrechnungen. Deswegen werden Regeln angewandt, die gewährleisten, dass jede Zelle nur einmal gezählt werden kann und somit eine möglichst exakte Hochrechnung und unverfälschte Ergebnisse gewährleisten.

1.3.3.1 Zählkriterium

Zunächst wird ein spezifisches Zählkriterium festgelegt. Dies ist ein bestimmtes Merkmal, dass jede Zelle nur genau einmal aufweist, beispielsweise der Nucleolus oder eine bestimmte Grenze einer Zelle sein. Während der Quantifizierung wird der UVCS entlang der z-Achse durchfokussiert. Das Zählkriterium wird gezählt, sobald es scharf im Fokus eingestellt wird. Ein Zählkriterium, das bereits außerhalb des UVCS scharf ist oder sich beim Durchfokussieren nicht scharf einstellen lässt, wird nicht gezählt. Dadurch wird sichergestellt, dass jede Zelle nur

in einem einzigen Schnitt gezählt werden kann. Hieraus ergibt sich die korrekte Anzahl an Zellen, unabhängig der Lage oder Größe einer Zelle. (Abb. 6).

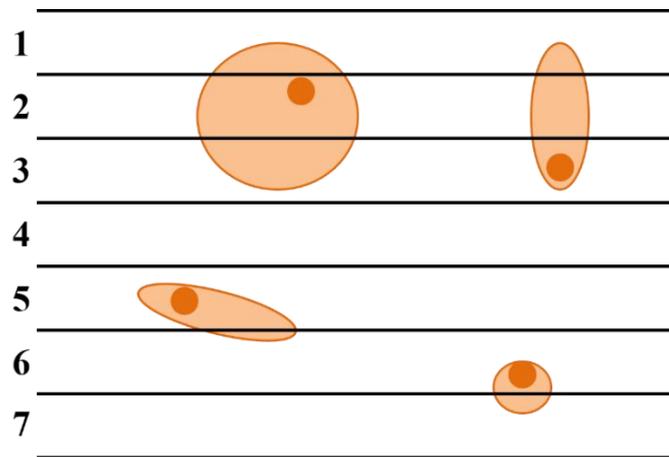


Abbildung 6: Gewebe mit Zellen und Zählkriterium (schematische Darstellung). Das Gewebe ist in sieben Schnitte unterteilt und enthält vier Zellen (orange). Als Zählkriterium wurde hier der Nucleolus (dunkelorange) festgelegt. Wird auf allen Schnitten das Zählkriterium gezählt, erhält man vier Zellen.

1.3.3.2 Ein- und Ausschlusslinien

Jeder Zählrahmen hat zwei Ein- und zwei Ausschlusslinien (Abb. 7). Diese definieren, welche Zellen gezählt werden. Jede Zelle, dessen Zählkriterium innerhalb des Zählrahmens liegt (Abb. 7, Zelle 4), wird gezählt. Liegt sie außerhalb des Zählrahmens, wird die Zelle nicht gezählt (Abb. 7, Zelle 2). Berührt das Zählkriterium eine Einschlusslinie, ohne dabei eine Ausschlusslinie zu schneiden, wird die Zelle gezählt (Abb. 7, Zelle 3). Berührt das Zählkriterium die Ausschlusslinie, dann wird die Zelle nicht gezählt (Abb. 7, Zelle 1). Diese Zelle 1 würde im angrenzenden Zählrahmen gezählt werden. Hierdurch wird gewährleistet, dass jede Zelle nur in einem einzigen Zählrahmen gezählt wird. Selbst wenn ein ganzer Schnitt ausgezählt würde und Zählrahmen an Zählrahmen grenzen würde, kann keine Zelle doppelt gezählt werden.

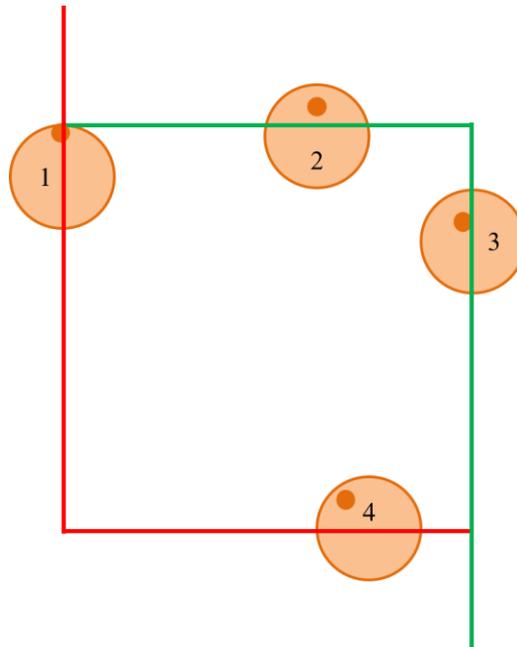


Abbildung 7: Zählrahmen mit Ein- und Ausschlusslinien (schematische Darstellung). Die roten Linien stellen die Ausschlusslinien des Zählrahmens dar, die grünen Linien die Einschlusslinien. Es sind vier Zellen dargestellt (orange). Als Zählkriterium wurde der Nucleolus (dunkelorange) festgelegt. Gezählt werden die Zellen, die innerhalb des Zählrahmens liegen oder eine Einschlusslinie berühren, ohne gleichzeitig eine Ausschlusslinie zu berühren.

1.3.4 Qualitätssicherung der stereologischen Untersuchung sowie der immunhistochemischen Färbung

Durch Schneiden des Gewebes kann es zu Unebenheiten und Zellverlust an den Schnittkanten kommen (Andersen and Gundersen 1999). Eine Sicherheitszone (*engl. guard zone*) an der oberen und unteren Seite (Abb. 8) verhindert, dass falsche Ergebnisse aufgrund von Zellverlusten errechnet werden.

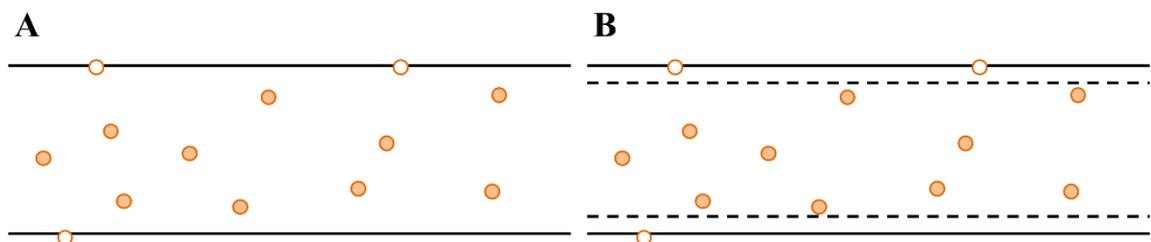


Abbildung 8: Vergleich zweier Schnitte unter Anwendung der Sicherheitszone (schematische Darstellung). In Abbildung A und in Abbildung B sieht man jeweils beispielhaft einen Schnitt mit Zellen (orange innerhalb des Schnitts, weiß an den Schnittkanten). Die weißen Zellen können durch das Schneiden der Schnitte beschädigt oder herausgelöst werden. In Abbildung B ist die Sicherheitszone dargestellt (gestrichelte Linie). Es werden nur die Zellen zwischen den Sicherheitszonen gezählt.

Eine homogene Färbung des Schnitts ist essenziell für eine qualitativ hochwertige Auswertung. Deswegen wird zunächst eine Pilotstudie durchgeführt. Die Schnitte werden analog der Hauptuntersuchung ausgezählt. Zeigt sich hierbei, dass an den oberen und unteren Seiten des Schnitts eine geringere Anzahl an Zellen gezählt wurde, sollte die Sicherheitszone erweitert werden. Lässt sich eine abnehmende Anzahl in der Mitte des Schnitts feststellen, ist der primäre oder sekundäre Antikörper nicht gut durch den Schnitt penetriert und es sollte eine Anpassung des Färbeprotokolls erfolgen.

1.3.5 Berechnung der Gesamtzellzahl

Ist die Zählung abgeschlossen, kann die Berechnung der Gesamtzellzahl mit folgender Formel berechnet werden (West et al. 1996; West, Slomianka, and Gundersen 1991):

$$N_{est} = \frac{\sum n}{ssf * asf * tsf}$$

- N_{est} (*engl. estimated total number of*) ist die geschätzte Gesamtanzahl der Zellen.
- $\sum n$ ist die Summe aller gezählten Zellen aus allen UVCS.
- Die „section sampling fraction“ (ssf) ergibt sich aus dem Anteil der untersuchten Schnitte. Bei beispielsweise drei Schnittserien, errechnet sich eine ssf von 1/3.
- Die „area sampling fraction“ (asf) ergibt sich aus dem Verhältnis der Größe der Grundfläche des UVCS zur Kantenlänge des Gitters. Beispielsweise könnte die Größe der Grundfläche des UVCS 20 x 20 μm^2 betragen und die des Gitters 100 x 100 μm^2 . Daraus ergäbe sich eine asf von $(20 \times 20) / (100 \times 100) = 1/25$.
- Die „thickness sampling fraction“ (tsf) ergibt sich aus dem Verhältnis der Höhe des UVCS zur Höhe des gesamten Schnitts. Beispielsweise könnte die Höhe des UVCS 10 μm und die Gesamtdicke des Schnitts 20 μm betragen, somit ergäbe sich eine tsf von $10/20 = 1/2$.

Die Berechnung der Gesamtzahl ist eine Schätzung bzw. Hochrechnung. Die Vorteile der „design-based“ Stereologie (Auszählung einer Schnittserie, jede Zelle wird nur einmal gezählt, jede Zelle hat die gleiche Chance gezählt zu werden) ermöglichen eine sehr exakte Schätzung ohne systematischen Fehler (*engl. unbiased*). Um dies zu verdeutlichen, stelle man sich vor, man zähle das gleiche Gewebe mehrmals aus. Die tatsächliche Anzahl an Zellen sei 70.000. In Tabelle (Tab.) 1 sind die Schätzungen von drei verschiedenen Auszählungen aufgelistet. Man sieht, dass der gebildete Mittelwert sich der tatsächlichen Anzahl an Zellen annähert. Führt man

dies unendlich oft fort, ergibt der Mittelwert die tatsächliche Anzahl an Zellen. Die Streubreite der Schätzungen kann ebenfalls berechnet werden (Schmitz and Hof 2005).

Tabelle 1: Beispielrechnung von drei Auszählungen mit Schätzung der Gesamtzellzahl und Mittelwert; geringe Streubreite.

1. Auszählung	Schätzung: 69.500 Zellen
2. Auszählung	Schätzung: 70.300 Zellen
3. Auszählung	Schätzung: 69.400 Zellen
Mittelwert: 69.733 Zellen	

Werden Gewebe mit einer ungleichmäßigen Verteilung der Zellen ausgezählt, hat dies zwar keinen Einfluss auf die Schätzung der Gesamtzellzahl, aber die Streubreite der Schätzungen nimmt zu (siehe Tab. 2). Die tatsächliche Anzahl der Zellen sei wieder 70.000. Man sieht, dass sich der Mittelwert erneut der tatsächlichen Anzahl annähert (Tab. 2). Damit die Streubreite möglichst gering bleibt, kann eine große Anzahl an UVCS gewählt werden. Es wird unwahrscheinlicher, dass zufällig alle UVCS in einer Region mit niedriger oder hoher Zelldichte liegen. Die erhöhte Anzahl UVCS hat dabei keinen Einfluss auf die Berechnung der Gesamtzellzahl, da die Anzahl der UVCS keine Variable in der Formel ist.

Tabelle 2: Beispielrechnung von drei Auszählungen mit Schätzung der Gesamtzellzahl und Mittelwert; höhere Streubreite.

1. Auszählung	Schätzung: 65.500 Zellen
2. Auszählung	Schätzung: 78.300 Zellen
3. Auszählung	Schätzung: 64.400 Zellen
Mittelwert: 69.400 Zellen	

1.4 Zielsetzung

Die schubförmige MS geht auch heutzutage noch in den meisten Fällen in einen sekundär progredienten Verlauf über. Für die Progredienz sind neurodegenerative Prozesse ein wichtiger pathologischer Faktor. Die meisten bisherigen Therapieoptionen konzentrieren sich allerdings auf die schubförmige MS und wirken immunmodulatorisch oder immunsuppressiv. Sie sind daher nicht geeignet die Progredienz der Erkrankung zu verhindern. Die weitere Erforschung der neurodegenerativen Prozesse ist ein erster wichtiger Schritt, um neue Angriffspunkte für potenziell neuroprotektive Medikamente zu ermitteln. Bis dato fehlten hierfür jedoch geeignete Auswertestrategien.

Mit der „design-based“ Stereologie ist als hochmoderne Methode die Quantifizierung von Strukturen möglich. Sie erbringt unverfälschte Ergebnisse von Gesamtzellzahlen und ist somit geeignet, selbst diskrete Unterschiede in der Neuronenanzahl zwischen Versuchsgruppen festzustellen. Als toxisches Mausmodell ist das Cuprizone-Modell bestens geeignet, neurodegenerative Prozesse unabhängig einer inflammatorischen Komponente zu untersuchen.

Ziel dieser Studie war daher, neurodegenerative Prozesse im Cuprizone-Modell mit Hilfe der „design-based“ Stereologie zu untersuchen. Als zentrale Fragen stellten sich:

1. Führt Cuprizone-induzierte Demyelinisierung zu einer Kortexatrophie?
2. Führt Cuprizone-induzierte Demyelinisierung zu einer geringeren Neuronendichte?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsgruppe

Für die Hauptuntersuchung wurden insgesamt 20 männliche Mäuse (C57BL/6JRj; Janvier, Frankreich) zu viert in einem Käfig gehalten. Es wurden 6 Mäuse ausgeschlossen, sodass für die Auswertung 14 Mäuse zur Verfügung standen (siehe Tab. 3). Für einen Parallelversuch wurden weitere 12 Mäuse ebenfalls zu viert in einem Käfig gehalten. Die Raumtemperatur der Tierhaltung betrug konstant zwischen 22°C und 24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 40-60 %. Der zirkadiane Rhythmus war auf eine Helligkeitsphase von 11 Stunden und 13 Stunden Dunkelheit eingestellt. Die Haltung der Tiere erfolgte im Physiologikum der LMU München. Der Versuch wurde von den Mitarbeitern der Neuroanatomie durchgeführt. Bei den Versuchen wurden die geltenden Tierschutzbestimmungen sowie die internationalen Richtlinien für Tierversuche befolgt. Die Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen lag gemäß § 8 Tierschutzgesetz durch die Regierung von Oberbayern vor (Tierversuchsgenehmigung: 55.2-1-54-2532-73-15).

Tabelle 3: Laborinterne Bezeichnung der Tiere, deren Versuchszugehörigkeit und verwendete Färbungen.

Kontrolltier	Versuchstier	Versuche	Färbung
TM140	TM145	Bestimmung der Kortexdicke, Bestimmung der Neuronendichte, stereologische Überprüfung der Färbung	anti- NeuN
TM141	TM146	Bestimmung der Kortexdicke, Bestimmung der Neuronendichte	anti-NeuN
TM142	TM147	Ausgeschlossen	
TM143	TM148	Bestimmung der Kortexdicke, Bestimmung der Neuronendichte	anti-NeuN
TM144	TM149	ausgeschlossen	
TM139	TM150	ausgeschlossen	
TM166	TM173	Bestimmung der Kortexdicke	anti-NeuN

TM167	TM174	Bestimmung der Kortexdicke	anti-NeuN
TM168	TM175	Bestimmung der Kortexdicke	anti-NeuN
TM169	TM176	Bestimmung der Kortexdicke	anti-NeuN
TM152	TM155	Validierung des Cuprizone-Modells (Parallelversuch)	anti-PLP, anti-IBA1

2.2 Verwendete Chemikalien und Materialien

In Tabelle 4 und 5 sind die verwendeten Chemikalien und Materialien mit entsprechendem Hersteller und der Bestellnummer aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
3,3' Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich	D-5905
Anti-IBA1	Wako	019-19741
Anti-Neuronal Nuclei (NeuN)	Merck Millipore	MAB377
Anti-PLP	Serotec	MCA839G
Chloralhydrat	Roth	K318.1
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich	15307
Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck Millipore	1.01036.0250
Cuprizone	Sigma-Aldrich	C-9012
DAB+ Chromogen + Substrat Puffer	Dako	K3468
DePeX	Serva	18243.2
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck Millipore	1.06580
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fluka	03685
Elite ABC-Kit	Vectastain	PK-6100

Essigsäure	Merck Millipore	1.00063
Ethanol	Merck Millipore	1.00983
Ethanol	CLN	N-1006.9025
Formaldehydlösung (37%)	Roth	CP10.2
Gelatine gepulvert	Merck Millipore	4078.0500
Hämatoxylin	Sigma	H3136-25G
Hydrogenperoxidase 30%	Roth	8070.4
Isopentan	VWR	24872.298
Isopropanol	VWR	20842.298
Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat	Merck	1042
Kresylviolett Acetat	Merck Millipore	5235
Methanol	Merck Millipore	1.06009.1000
Natriumacetat	Merck Millipore	1.06268.0250
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck Millipore	1.06346.0500
Natriumjodat	Merck	6525
Natronlauge 40%	Roth	4347.1
Normalserum	Vector	S-1000
Paraffin	VWR-Merck	1.07158
PBS Dulbecco	Merck/Biochrom	L 182-50
Salzsäure 1 molar	Merck Millipore	1.09057
Sekundärantikörper (Immunglobulin G (IgG)) Ziege Anti-Maus (biotinyliert)	Vector	BA-9200

Sekundärantikörper (IgG) Ziege Anti-Kaninchen (biotinyliert)	Vector	BA-1000
Tris	PUFFERAN; Roth	4855.2
Triton-X-100	Merck	1.08603.1000
VECTASTAIN ABC-Kit	Vector	PK-4000
Xylol	VWR	30 28975.325
Xylol	Merck	28975.462
Zitronensäure Monohydrat	Merck	1.00244.0500

Tabelle 5: Verwendete Materialien.

Materialien	Hersteller	Bestellnummer
Atraumatische Pinzette, 105mm	VWR	232-0086
Atraumatische Pinzette, 300mm	VWR	232-0093
Deckgläschen, 24x60 mm	Menzel Gläser	BB024060A1
Filterpapier	Macherey-Nagel	
Haushaltsschere	VWR	233-0018
Kreisschüttler	VWR	444-9213
Laborschere, 130 mm	VWR	233-1221
Microlance Kanüle	BD	30400
Mikrotomklinge	Feather	C35
Multiwell-Zellkulturplatte, 24 Well	VWR	734-2325
Multiwell-Zellkulturplatte, 6 Well	VWR	734-2323

Objektträger Superfrost ®	VWR	631-0912
Original-Perfusor® Line, 150 cm	BRAUN	8722935
Präpariernadel	VWR	631-7152
Safety-Multifly® Kanüle	Sarstedt	851.638.235
Spritze, 1 ml	BD	300013
Spritze, 20 ml	BD	301625
Spritze, 50 ml	BRAUN	8728844F
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Fisher scientific	14-432-22

2.3 Versuchsdurchführung

Die männlichen Mäuse (C57BL/6JRj) erreichten nach zehn Wochen ein Gewicht von 19-21 g. Es erfolgte die randomisierte Zuteilung in eine Kontroll- und eine Versuchsgruppe. Die Kontrollgruppe erhielt konventionelles Haltungsfutter, die Versuchsgruppe bekam für einen Zeitraum von fünf Wochen 0,25 % Cuprizone-haltiges Futter. Für die Herstellung des Futters wurden 0,75 g Cuprizone auf 300 g gemahlene Haltungsfutter abgewogen und vermengt. Die 300 g wurden auf drei Käfige mit jeweils zwei Petrischalen à 50 g Futter verteilt. Die Fütterung wurde jeden Tag vorgenommen. Die Käfige wurden jeden dritten Tag gewechselt. Die Käfige waren mit Einstreu gefüllt sowie mit einer Trinkflasche, einem Häuschen und Nestbaumaterial ausgestattet.

2.4 Transkardiale Perfusion und Materialgewinnung

Zur Materialgewinnung wurden die Tiere nach einem Zeitraum von fünf Wochen mittels 10 %-iger Chloralhydratlösung (2 g Chloralhydrat in 20 ml Phosphate-buffered saline (PBS)) narkotisiert. Anschließend erfolgte die transkardiale Perfusion mit eisgekühltem PBS und frischer Paraformaldehydlösung (PFA). Die Arbeitsschritte zur Herstellung von PFA können Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Protokoll zu Herstellung von Paraformaldehyd.

Lösung	Chemikalien

3,7 % PFA	<ul style="list-style-type: none"> • 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) • 8 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) • 100 ml 37 % Formaldehyd • pH-Wert auf 7,4 einstellen • Mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) auf 1 l auffüllen
PBS	<ul style="list-style-type: none"> • PBS Dulbecco Pulver • Mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen (10x; Stocklösung) • 500 ml Stocklösung • Mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen (1x)

Danach wurde der Kopf abgetrennt, die Schädelkalotte eröffnet und in 3,7 % PFA bei 4° C nachfixiert. Nach 24 Stunden wurde das Gehirn herauspräpariert. 20 Gehirne wurden kryoprotectiert. Weitere 12 Gehirne wurden in Paraffin für einen Parallelversuch eingebettet.

2.5 Kryoprotektion und Anfertigung von Kryoschnitten

Die Gehirne wurden in PBS gespült und in Sucroslösungen mit aufsteigender Konzentration (10%, 20%, 30%) gegeben. Hierdurch wird die Ausbildung von Kristallen innerhalb des Gewebes verhindert, die beim Einfrieren zu einer Zerstörung der Gewebestruktur führen würden. Die Herstellung der Lösungen und Einbettung der Gehirne erfolgte wie in Tabelle 7 beschrieben.

Tabelle 7: Lösungen und Arbeitsschritte für die Kryoprotektion.

Zeit	Lösung	Chemikalien
• 1 Stunde	PBS (1x)	
• Über Nacht	PBS (1x)	
• 1 Stunde	PBS (1x)	
• 9 Stunden	10% Sucrose	• 10 g Sucrose

<ul style="list-style-type: none"> • Dann Wechsel der Lösung und erneut 15 Stunden • Bei 4°C 		<ul style="list-style-type: none"> • Mit PBS (1x) auf 100 ml auffüllen
<ul style="list-style-type: none"> • 9 Stunden • Dann Wechsel der Lösung und erneut 15 Stunden • Bei 4°C 	20% Sucrose	<ul style="list-style-type: none"> • 20 g Sucrose • Mit PBS (1x) auf 100 ml auffüllen
<ul style="list-style-type: none"> • 9 Stunden • Dann Wechsel der Lösung und erneut 15 Stunden • Bei 4°C 	30% Sucrose	<ul style="list-style-type: none"> • 30 g Sucrose • Mit PBS (1x) auf 100 ml auffüllen

Danach wurden die Gehirne in Isopentan bei -75°C für 1,5 Minuten tiefgefroren und für eine weitere Minute in Trockeneis gelegt. Die Gehirne wurden bis zum Schneiden bei -20°C gelagert. Das Schneiden erfolgte am Kryostaten (Leica CM1950) bei -20°C. Dazu wurden die Gehirne mittels Tissue-Tek auf dem Objekthalter aufgefroren und 40 µm dick koronar geschnitten. Es wurden insgesamt sieben Gehirnpaare geschnitten. Drei Gehirnpaare wurden zwischen Region 215 und 265 (Sidman 1971) (Abb. 9 und 10) geschnitten und fortlaufend in PBS in einer 24-Well Platte gesammelt. Vier Gehirnpaare wurden komplett geschnitten und in PBS gesammelt.

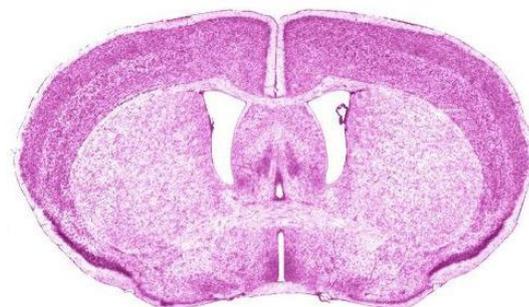


Abbildung 9: Region 215 (Sidman 1971) in der Frontalansicht.

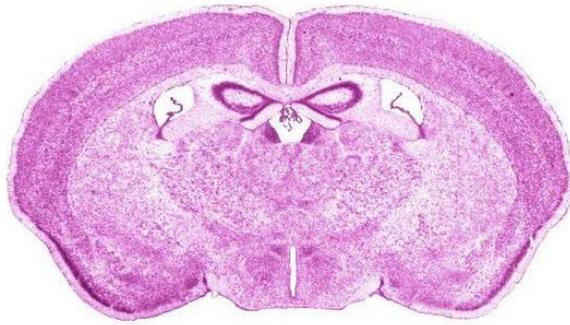


Abbildung 10: Region 265 (Sidman 1971) in der Frontalansicht.

2.6 Paraffineinbettung

Die Gehirne für die Paraffineinbettung wurden in Einbettkassetten gegeben und in Leitungswasser gespült. Die weiteren Schritte können Tabelle 8 entnommen werden. Die Arbeitsschritte im Paraffin erfolgten bei 58°C. Alle übrigen Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur (RT).

Tabelle 8: Arbeitsschritte der Paraffineinbettung.

Zeit	Lösung
• 5 h	• Fließendes Leitungswasser
• Über Nacht	• Ethanol 50 %
• 2 x 40 min	• Ethanol 70 %
• 3 x 40 min	• Ethanol 96 %
• 40 min	• Ethanol 100 %
• 2 x 60 min	• Ethanol 100 %
• 3 x 40 min	• Xylol
• 2 x 60 min	• Paraffin
• 2 d	• Paraffin

2.7 Histologische Aufbereitung der Schnitte

2.7.1 Beschichtung der Objektträger mit 0,5 %-iger Gelatine

Für eine bessere Haftung der Schnitte auf den Objektträgern wurden diese mit 0,5 % Gelatine beschichtet. Die Gelatinelösung wurde wie in Tabelle 9 beschrieben hergestellt. Die Objektträger (SuperFrost) wurden 30-mal in die Lösung eingetaucht und über Nacht bei 60° C getrocknet.

Tabelle 9: Protokoll zur Herstellung von 0,5 %-igen Gelatine-Objektträgern.

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

2.7.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung wurde nach der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode durchgeführt (Abb. 11). Dies ist eine indirekte Nachweismethode, für die ein Primär- und ein Sekundärantikörper benötigt werden. Als erstes erfolgt die Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid, damit das Substrat nicht verfrüht umgesetzt wird. Danach werden mit dem Serum des Tieres, in dem der Sekundärantikörper hergestellt wurde, freie Bindungsstellen blockiert. Hierdurch werden unspezifische Bindungen reduziert. Anschließend wird der Primärantikörper hinzugegeben. Dieser bindet spezifisch an das nachzuweisende Antigen. Der biotinylierte Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und bindet an diesen. Danach erfolgt die Zugabe des Avidin-Biotin-Komplex. Das Avidin bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers. Im letzten Schritt wird das Antigen sichtbar gemacht. Hierfür wird das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) mit Wasserstoffperoxid vermengt. Das Wasserstoffperoxid bewirkt, dass die im Avidin-Biotin-Komplex enthaltene Peroxidase das phenolische Substrat des DABs in sein unlösliches Substrat katalysiert. Hierdurch erhält das DAB seine bräunliche Farbe und macht somit das Antigen sichtbar.

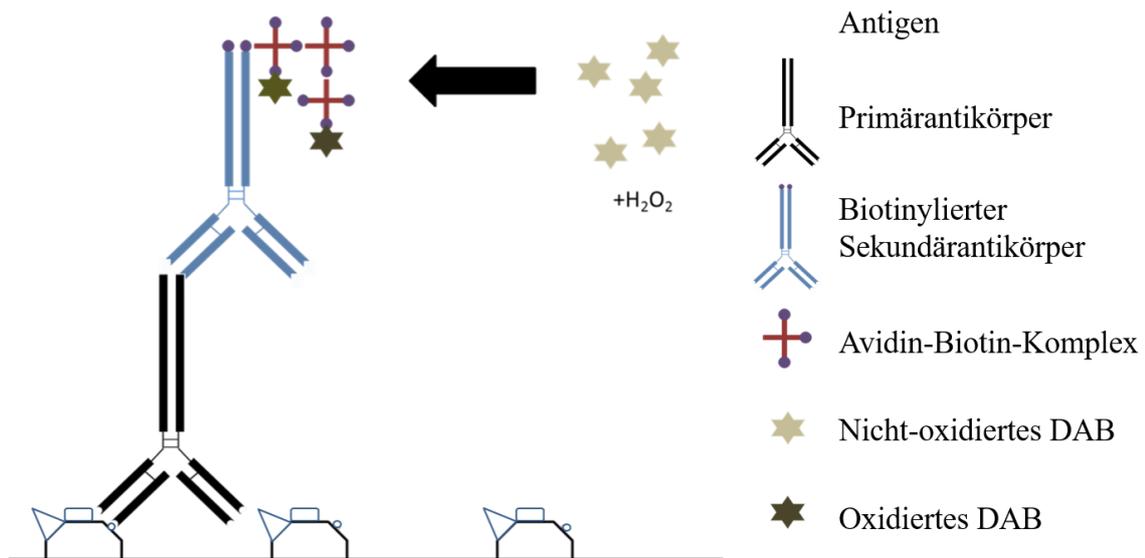


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung. Zu sehen ist, dass der Primärantikörper an sein spezifisches Antigen gebunden hat. Die weiteren Reagenzien wie der Sekundärantikörper und der Avidin-Biotin-Komplex konnten ebenso binden. Das DAB wurde durch das hinzugefügte H_2O_2 oxidiert und macht somit das gebundene Antigen sichtbar.

2.7.2.1 Immunhistochemische Färbung der kryoeingebetteten Schnitte

Für die Quantifizierung der Neurone wurde der monoklonale Antikörper anti-NeuN (Neuronal Nuclei) verwendet. Hierfür wurde der Antikörper in 10 % igem Normalserum verdünnt (1:3000). Der Antikörper bindet hochspezifisch an nukleäre Proteine von Neuronen. Für diese immunhistochemische Färbung wurden die kryoeingebetteten Schnitte verwendet. Diese befanden sich nach dem Schneiden frei flottierend in mit PBS gefüllten Wells. Für die gesamte Färbung verblieben die Schnitte im selben Well. Es wurde jeder dritte Schnitt mit dem Antikörper anti-NeuN immunhistochemisch angefärbt. Die weiteren Lösungen, die für die immunhistochemische Färbung benötigt wurden, sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die zeitliche Abfolge der einzelnen Schritte ist in Tabelle 11 angegeben. Die Negativkontrolle wurde analog der immunhistochemischen Färbung angefertigt. Die Schnitte wurden für diesen Schritt in das Normalserum ohne Primärantikörper gegeben.

Nachdem die Färbung abgeschlossen war, wurden die Schnitte auf 0,5% gelatinierte Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden alle Schnitte mit DePeX eingedeckt und für 24 Stunden luftgetrocknet.

Tabelle 10: Protokoll zur Herstellung der für die immunhistochemischen Färbung benötigten Chemikalien.

Lösung	Chemikalien
PBS (1x)	<ul style="list-style-type: none"> • Siehe Tabelle 5
Peroxidase-Blocker	<ul style="list-style-type: none"> • 220 ml 100 % Methanol • 22 ml 30 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) • Mit PBS auf 2200 ml auffüllen
1 % Triton X-100 (Stocklösung)	<ul style="list-style-type: none"> • 2 ml Triton X-100 • Mit PBS auf 200 ml auffüllen
0,1 % Triton X-100 (Gebrauchslösung)	<ul style="list-style-type: none"> • 1:10 Verdünnung der Stock-Lösung mit PBS
10% Normalserum der Ziege in 0,1 % Triton	<ul style="list-style-type: none"> • 1300 µl Normalserum • 1170 µl 1 % Triton (Stocklösung) • 10530 µl PBS
Primärantikörper anti-NeuN (Maus IgG) 1:3000	<ul style="list-style-type: none"> • 3 µl anti-NeuN Antikörper • 900 µl Normalserum • 810 µl 1 % Triton (Stocklösung) • 7287 µl PBS
Sekundärantikörper Anti- Maus 1:500	<ul style="list-style-type: none"> • 14 µl Sekundärantikörper; biotinyliert • 699 µl Normalserum • 629 µl 1 % Triton (Stocklösung) • 5658 µl PBS
Avidin-Biotin-Komplex	<ul style="list-style-type: none"> • 260 µl A • 260 µl B • 12480 µl PBS
3,3' DAB	<ul style="list-style-type: none"> • 13000 µl DAB

	<ul style="list-style-type: none"> • 26 µl H₂O₂
--	--

Tabelle 11: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung mit anti-NeuN.

Zeit	Lösung
• 3 x 15 min (RT)	• PBS (1x) (waschen)
• 1 h im Dunkeln (RT)	• Peroxidase-Blocker
• 2 x 15 min (RT)	• PBS (1x) (waschen)
• 1 x 15 min (RT)	• 0,1 % Triton (waschen)
• 2 h (RT)	• 10 % Normalserum (blocken)
• Über Nacht (ca. 15 h), bei +4°C	• Primärantikörper
• 2 x 15 min (RT)	• PBS (1x) (waschen)
• 1 x 15 min (RT)	• 0,1 % Triton (waschen)
• 2 h (RT)	• Sekundärantikörper
• 3 x 15 min (RT)	• PBS (1x) (waschen)
• 2 h (RT)	• Streptavidin
• 3 x 15 min (RT)	• PBS (1x) (waschen)
• 10 min (RT)	• DAB
• 2 x 15 min (RT)	• Leitungswasser
• 15 min (RT)	• PBS (1x)

2.7.2.2 Immunhistochemische Färbung der paraffineingebetteten Schnitte

Die paraffineingebetteten Gehirne wurden 5 µm dick geschnitten und immunhistochemisch angefärbt. Die Demyelinisierung wurde mit dem Antikörper gegen das Proteo-Lipo-Protein (PLP) gezeigt, die Mikrogliose wurde mithilfe des Antikörpers gegen ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1). Die Lösungen für die Färbungen wurden wie in Tabelle 12

beschrieben hergestellt. Die Arbeitsschritte der Färbungen finden sich in Tabelle 13. Anschließend wurden alle Schnitte mit DePeX eingedeckt und für 24 Stunden luftgetrocknet.

Tabelle 12: Protokoll zur Herstellung der Lösungen für die anti-IBA1- und anti-PLP-Färbungen.

Lösung	Chemikalien
<ul style="list-style-type: none"> • Tris/EDTA 	<ul style="list-style-type: none"> • 6,05 g Tris • 1,85 g EDTA Dinatrium Dihydrat • pH-Wert mit HCl auf 9,0 einstellen • Auf 5 l mit Aqua dest. auffüllen
<ul style="list-style-type: none"> • 5 % Normalserum der Ziege in PBS 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 ml Normalserum • 95 ml PBS • als Aliquots bei -20° C lagern
<ul style="list-style-type: none"> • Primärantikörper anti-PLP 1:5000 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µl anti-PLP Antikörper • 4999 µl 5 % Normalserum in PBS
<ul style="list-style-type: none"> • Primärantikörper anti-IBA1 1:5000 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µl anti-IBA1 Antikörper • 4999 µl 5 % Normalserum in PBS
<ul style="list-style-type: none"> • Peroxidaseblocker 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 µl H₂O₂ • 997 µl PBS
<ul style="list-style-type: none"> • Sekundärantikörper Anti-Maus 1:200 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 µl Sekundärantikörper; biotinyliert • 995 µl 5 % Normalserum in PBS
<ul style="list-style-type: none"> • Sekundärantikörper Anti-Hase 1:200 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 µl Sekundärantikörper; biotinyliert • 995 µl 5 % Normalserum in PBS
<ul style="list-style-type: none"> • Avidin-Biotin-Komplex 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 µl A • 20 µl B • 960 µl PBS
<ul style="list-style-type: none"> • 3,3' DAB 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 µl DAB Stock

	<ul style="list-style-type: none"> • 980 µl Substrat
--	---

Tabelle 13: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung mit anti-IBA1 und anti-PLP.

Zeit	Lösung
• 3 x 10 min (RT)	• Xylol 100 % (entparaffinieren)
• 5 min (RT)	• Xylol / Ethanol 50 % (entparaffinieren)
• 2 x 3 min (RT)	• Ethanol 100 % (entparaffinieren)
• 2 x 3 min (RT)	• Ethanol 96 % (entparaffinieren)
• 3 min (RT)	• Ethanol 70 % (entparaffinieren)
• 3 min (RT)	• Ethanol 50 % (entparaffinieren)
• 3 min (RT)	• Aqua dest. (entparaffinieren)
• IBA1: Erhitzen, dann 10 min köcheln	• Tris/EDTA (Demaskierung)
• 3 x 5 min (RT)	• PBS (waschen)
• 1 h, bei +20°C	• 5 % Normalserum (blocken)
• Über Nacht (ca. 15 h), bei +4° C, in Feuchtekammer	• Primärantikörper
• 3 x 15 min (RT)	• PBS (waschen)
• 2 h, bei +20°C	• Sekundärantikörper
• 3 x 15 min (RT)	• PBS waschen
• 1 h, bei +20°C	• ABC
• 3 x 15 min (RT)	• PBS
• 10 min (RT)	• DAB
• 5 min (RT)	• Leitungswasser
• 5 min (RT)	• Aqua dest.
• 3 min (RT)	• Ethanol 50 %

• 3 min (RT)	• Ethanol 70 %
• 2 x 3 min (RT)	• Ethanol 96 %
• 2 x 3 min (RT)	• Ethanol 100 %
• 5 min (RT)	• Xylol / Ethanol 50 %
• 3 x 10 min (RT)	• Xylol 100 %

2.8 Erhebung der Daten

Alle Daten wurden mithilfe des Programms Stereo Investigator (Version 11.07; MBF Bioscience, Williston, ND, USA) erhoben.

2.8.1 Bestimmung der Kortexdicke

Die Kortexdicke wurde in zwei unabhängigen Versuchen mit zunächst drei und dann mit vier Versuchs- und Kontrolltieren gemessen. Die Messung wurde an kryoprotektierten, anti-NeuN-gefärbten Schnitten durchgeführt. Es wurden die Regionen 265 und die Region 235 (Sidman 1971) untersucht (Abb.12).

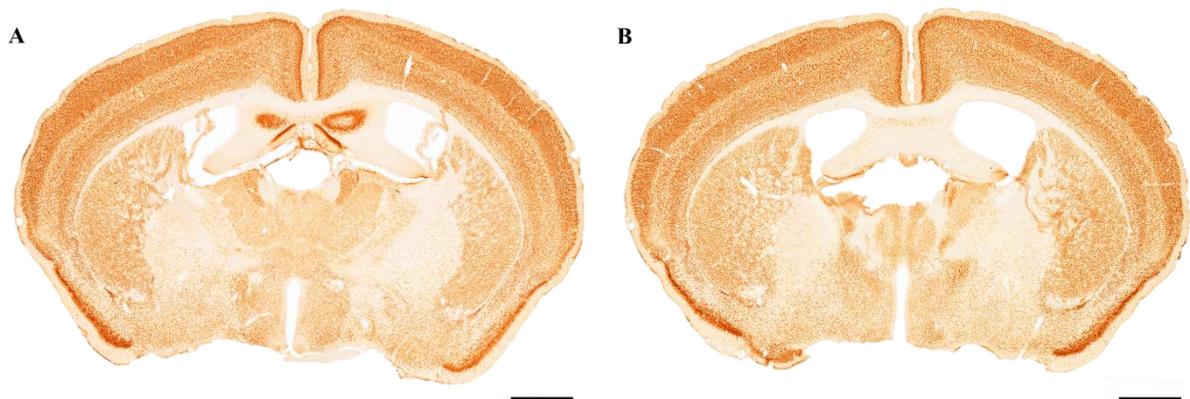


Abbildung 12: Repräsentative anti-NeuN-gefärbte Schnitte der Regionen, in denen die Kortexdicke gemessen wurde. Abb. A zeigt die Region 265, Abb. B zeigt die Region 235 (Sidman 1971). Anti-NeuN-Färbung. 10x Vergrößerung. Maßstab = 1000 μ m.

Die Kortexdicke wurde sowohl in der linken als auch in der rechten Kortexhemisphäre gemessen. Die erste Messung wurde entlang der Grenze zwischen Lamina 1 und Lamina 2 vorgenommen, parallel zur Fissura longitudinalis cerebri (siehe Abb. 13). Die zweite Messung erfolgte senkrecht von der Spitze des Cingulum bis zum äußeren Rand der Lamina 1 (siehe

Abb. 13). Aufgrund von Beschädigungen sind für die Region 265 drei Schnitte, für die Region 235 ein Schnitt, ausgeschlossen worden.



Abbildung 13: Repräsentativer anti-NeuN-gefärbter Schnitt der Region 265, in der die Kortexdicke gemessen wurde. Es sind die beiden Messpunkte eingezeichnet, an denen die Kortexdicke bestimmt wurde. Anti-NeuN-Färbung. 10x Vergrößerung. Maßstab = 1000 μm .

2.8.2 Stereologische Überprüfung der anti-NeuN-Färbung

In einer Pilotstudie wurde die neu etablierte immunhistochemische Färbung mit anti-NeuN bezüglich einer gleichmäßigen Färbung überprüft. Hierfür wurde je ein Kontroll- und ein Versuchstier ausgezählt. Es wurden die in Tabelle 14 aufgelisteten stereologischen Parameter verwendet. Es erfolgte die Auswertung hinsichtlich einer homogenen Verteilung der NeuN⁺-Zellen entlang der Z-Achse der Schnitte.

2.8.3 Parameter der „design-based“ Stereologie

Als eindeutiges Zählmerkmal wurde die obere linke Ecke einer Zelle festgelegt. Die Zielgröße an gezählten Zellen pro Individuum für eine valide Hochrechnung sind in der Literatur verschieden angegeben. Sie variieren zwischen einer Mindestanzahl von 100 – 200 (West 1993) und 700 – 1000 (Schmitz and Hof 2000). Für eine hohe Validität bei angemessenem Zeitaufwand wurde als Zielwert eine Mindestanzahl an gezählten Zellen von 600 Zellen pro Individuum angestrebt. Bei durchschnittlich 8 Schnitten pro Tier ergab sich eine Mindestanzahl von 75 Zellen pro Schnitt. Da die Zellkörper der Neurone im sensiblen Kortex eine mittlere Größe von 7 bis 10 μm aufweisen, wurde die Größe des Zählrahmens auf 30 μm x 30 μm festgelegt. In einer Pilotstudie wurde eine Gittergröße von 200 μm x 200 μm für eine entsprechende Mindestanzahl an Zellen ermittelt. Des Weiteren wurde im Rahmen der

Pilotstudie die tatsächliche Schnittdicke, die Höhe des Sicherheitsabstandes sowie die Höhe des UVCS ermittelt. Nach Prozessierung betrug die tatsächliche Schnittdicke im Mittel 24,45 μm . Als Sicherheitsabstand wurden 2 μm festgelegt. Um Schwankungen der Schnittdicke zu berücksichtigen, wurde die Höhe des UVCS auf 15 μm festgelegt. Durch Veränderung der Fokusebene des Objektivs innerhalb der 15 μm wurde der UVCS generiert. Abbildung 14 zeigt beispielhaft einen anti-NeuN-gefärbten Schnitt in zwei unterschiedlichen Fokusebenen. Darüber gelegt sind das 200 μm x 200 μm Zählgitter mit den 30 μm x 30 μm großen Zählrahmen. Die Pfeile zeigen jeweils auf die scharf eingestellten Zellen. Aus den Werten für die Größe des Zählrahmens sowie des Gitters ergibt sich die asf (siehe Tab. 14). Die mittlere tsf ergibt sich aus dem Quotienten der Höhe der UVCS (15 μm) zur tatsächlichen mittleren Schnittdicke aller Schnitte nach Prozessierung (21,7 μm). Die ssf ergibt sich aus der Anfertigung lückenloser Schnittserien der Gehirne, von denen jeweils der dritte Schnitt nach dem SRS-Prinzip ausgewählt und ausgewertet wurde.

Tabelle 14: Parameter für die Verwendung des stereologischen Arbeitsplatzes.

Parameter	
Größe des Gitters	200 μm x 200 μm
Größe des Zählrahmens	30 μm x 30 μm
Sicherheitsabstand	2 μm
Tiefe der Z-Achse	15 μm
Eindeutiges Zählmerkmal	Obere linke Ecke einer Zelle
asf	$(30 \times 30) / (200 \times 200)$
Mittlere tsf	15/21,7
ssf	1/3
Mittlere Gesamtzellzahl pro Gehirn	654,5

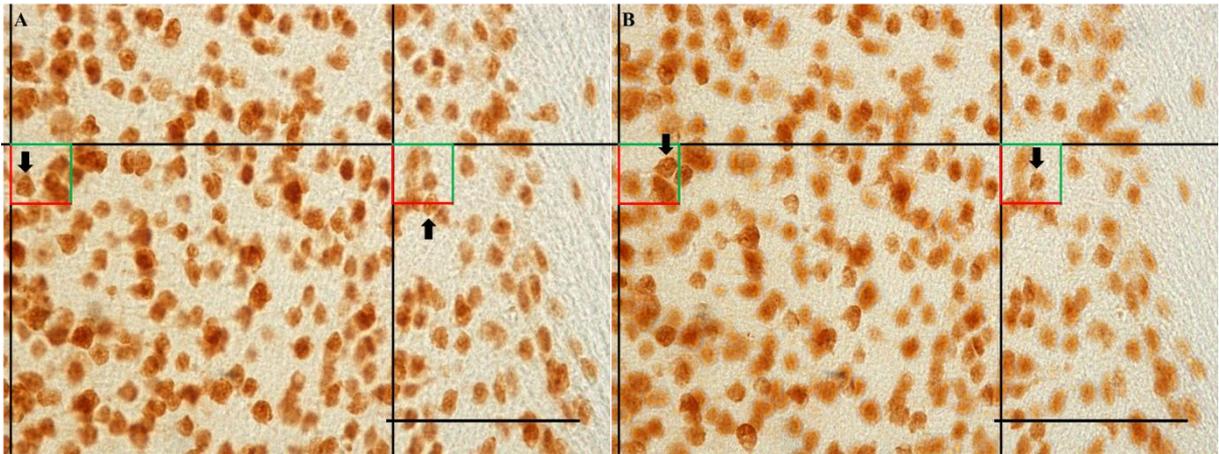


Abbildung 14: Unterschiedliche Fokusebenen desselben Schnitts mit Gitter (200 µm x 200 µm) und Zählrahmen (30 µm x 30 µm). In Abbildung A sind andere Zellen fokussiert als in Abbildung B (Pfeile). Durch Veränderung der Fokusebene wird der UVCS generiert. Anti-NeuN-Färbung. 40 x Vergrößerung. Maßstab = 100 µm.

2.8.4 Bestimmung der Dichte NeuN⁺- Zellen im sensiblen Kortex

Es wurden jeweils drei Kontroll- und drei Versuchstiere ausgewertet, da aufgrund einer großen Varianz in der Schnittanzahl 4 Tiere ausgeschlossen wurden. Die Dichte der Zellen wurde als NeuN⁺-Zellen/UVCSs bestimmt. Alle Gehirne waren kryoprotectiert. Die Anzahl der Schnitte pro Tier lag bei acht bis zehn. Der Zählbereich war die Lamina 6 des primär sensiblen Kortex in den Regionen 215-265 (Sidman 1971) und wurde in fünf einzelnen Regionen ausgewertet (siehe Tab. 15).

Tabelle 15: Unterteilung des Zählbereichs Region 215-265 (Sidman 1971).

R1	Region 215-225
R2	Region 225-235
R3	Region 235-245
R4	Region 245-255
R5	Region 255-265

Die mediale Begrenzung des Zählbereichs stellte eine Senkrechte parallel zur Fissura longitudinalis cerebri über dem Cingulum dar. Die laterale Begrenzung des primär sensiblen Kortex war eine manuell eingezeichnete Linie. Diese wurde im 22° Winkel an eine Waagerechte im Mittelpunkt des Schnittes gezogen. Die untere Begrenzung stellte das Corpus

callosum dar. Die Abgrenzung der Lamina 6 gegenüber der Lamina 5 wurde anhand der unterschiedlichen Zelltypen der beiden Laminae vorgenommen. In Vergleich zur Lamina 6 sind in Lamina 5 besonders große Pyramidenzellen zu finden. Anhand der anatomischen Landmarken und Charakteristika wurde der Zählbereich mit dem Programm „Stereo Investigator“ umfahren. In Abbildung 15 ist beispielhaft ein Schnitt mit dem umrandeten Zählbereich dargestellt. Die Hilfslinien an den anatomischen Landmarken sind ebenfalls eingezeichnet. Es wurde immer die rechts auf dem Objektträger befindliche Gehirnhälfte ausgezählt.

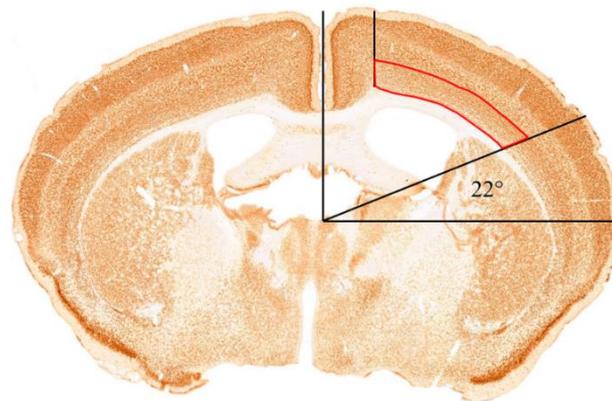


Abbildung 15: Anti-NeuN-gefärbter Schnitt mit eingezeichnetem Untersuchungsbereich. Umrandung des Untersuchungsbereiches (rote Markierung) anhand von anatomischen Landmarken (schwarze Linien). Anti-NeuN-Färbung. 10 x Vergrößerung. Maßstab = 1000 μ m

2.8.5 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden auf eine Normalverteilung mittels des D'Agostino und Pearson Tests getestet.

Für die Analyse der Kortexdicke wurden zunächst die Mittelwerte und deren Standardabweichungen für die einzelnen Regionen berechnet. Mit den berechneten Werten wurde mittels des Mann Whitney Tests auf einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe getestet ($p < 0,05$). Für die graphische Darstellung sind die Mittelwerte der Versuchsgruppe als Prozent der Kontrollgruppe angegeben.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen regionenspezifischen Werte der Messung 1 zusammengefasst. Dann wurden die Ergebnisse der Messung 1 der Kontroll- und der Versuchsgruppe auf einen signifikanten Unterschied getestet (unpaired t-Test, $p < 0,05$). Analog

wurde mit der Messung 2 verfahren. Sämtliche Berechnungen wurden mit der GraphPad Prism Software durchgeführt.

Die Dichte der NeuN⁺-Zellen wurde als NeuN⁺-Zellen/UVCS angegeben. Die Dichte wurde in fünf Regionen bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte bei Normalverteilung mittels two-way analysis of variance (two-way ANOVA) und mit der Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Dann wurden die Regionen zusammengefasst und mit dem Mann Whitney Test auf Signifikanz getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Validierung des Cuprizone-Modells

Das Cuprizone-Modell wird unter anderem zur Erforschung neurodegenerativer Prozesse der MS verwendet. Die Intoxikation mit Cuprizone führt zu einer Oligodendrozytenapoptose und somit zur Demyelinisierung, gefolgt von Mikrogliazellaktivierung (Kipp et al. 2017). Die Versuchsgruppe dieser Arbeit erhielten über einen Zeitraum von fünf Wochen Cuprizone-haltiges Futter. Die bekannten histopathologischen Veränderungen durch Cuprizone-Intoxikation wie Demyelinisierung und Mikrogliazellaktivierung wurden im medialen Corpus callosum und im Kortex untersucht. Hierfür wurden paraffineingebettete Gehirnschnitte von Kontroll- und Versuchsgruppe gegen PLP und IBA1 gefärbt und miteinander verglichen.

3.1.1 Cuprizone-Intoxikation führt zu Demyelinisierung

PLP ist das am häufigsten vorkommende Protein der Myelinscheide (Nave et al. 1987; Boison et al. 1995) und kann somit zur Beurteilung des Myelinisierungsgrad herangezogen werden. Die Gehirnschnitte der Kontrollgruppe zeigten eine vollständige Myelinisierung im Corpus callosum (Abb. 16A). Die Versuchsgruppe zeigte ein stark demyelinisiertes Corpus callosum (Abb. 16B). Die zerebralen Kortexe der Versuchsgruppe zeigten ebenfalls im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine Demyelinisierung (Abb. 17 A, B). Dies spricht für eine valide Durchführung und Verwendung des Cuprizone-Modells.

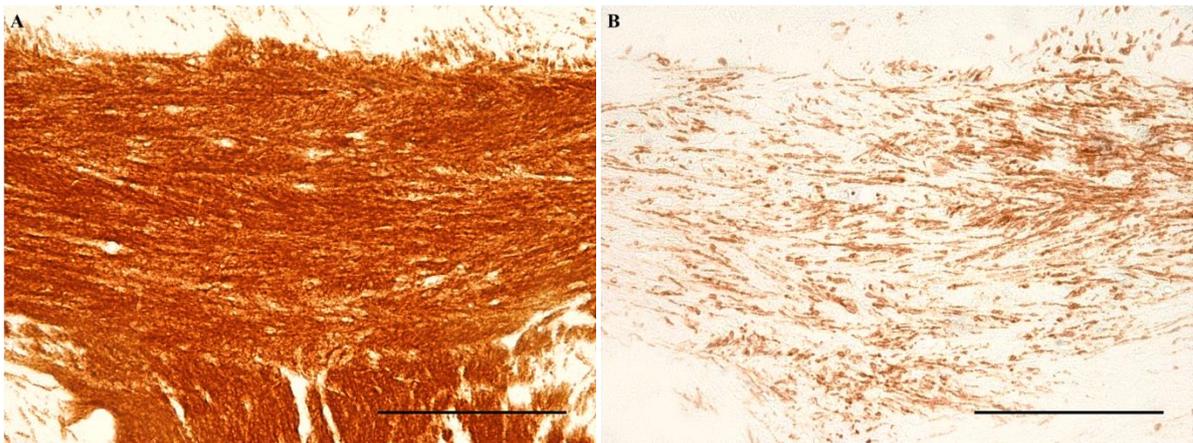


Abbildung 16: Anti-PLP-Färbungen, repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum. Zu sehen sind gegen PLP gefärbte Schnitte eines Kontroll- (A) und eines Versuchstieres (B). Das Versuchstier zeigt im Vergleich zum Kontrolltier eine Demyelinisierung. Maßstab = 100 μm .

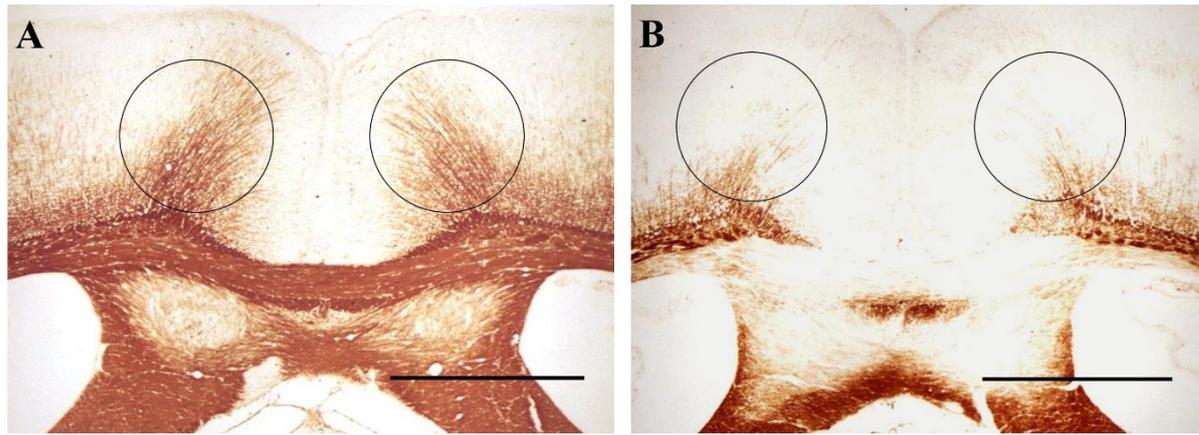


Abbildung 17: Anti-PLP-Färbungen. Übersichtsaufnahmen. Zu sehen sind gegen PLP gefärbte Schnitte eines Kontroll- (A) und eines Versuchstieres (B). In A sieht man die angefärbten Myelinscheiden im Kortex (Kreise). Im Vergleich dazu ist in B deutlich weniger Myelin angefärbt (Kreise). Maßstab = 500 μ m.

3.1.2 Cuprizone-Intoxikation führt zu Mikrogliazellaktivierung

IBA1 wird spezifisch in Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert. Mikrogliazellen sind im Ruhezustand durch einen kleinen Zellkörper und lange verzweigte Fortsätze gekennzeichnet. In aktiver Form sind sie durch einen großen runden Zellkörper mit kurzen Fortsätzen charakterisiert. Die Kontrollgruppe zeigte nur wenige IBA1-positive Zellen im medialen Corpus callosum. Diese hatten zum größten Teil kleine Zellkörper und lange verzweigte Fortsätze (Abb. 18A). Die Versuchsgruppe zeigte im Unterschied zu der Kontrollgruppe eine erhöhte anti-IBA1-Immunreaktivität. Dies zeigt sich morphologisch durch ein rundes, amöboides und Makrophagen-ähnliches Aussehen (Abb. 18B). Die zerebralen Kortexe der Versuchsgruppe wiesen ebenfalls im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine erhöhte anti-IBA1-Immunreaktivität auf (Abb. 19 A, B). In Zusammenschau mit den obigen Ergebnissen konnte somit das Cuprizone-Modell validiert werden.

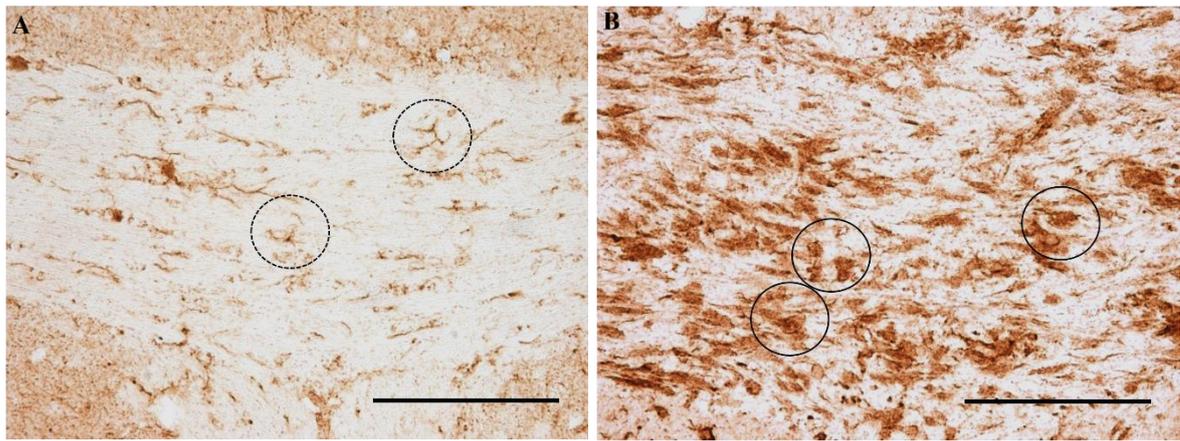


Abbildung 18: Anti-IBA1-Färbungen, repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum. Zu sehen sind gegen IBA1 gefärbte Schnitte eines Kontroll- (A) und eines Versuchstieres (B). In (A) sieht man ruhende Mikrogliazellen (gepunktete Umrandung). Im Vergleich dazu sind in (B) mehrere aktivierte Mikrogliazellen zu sehen. Maßstab = 100 μm .

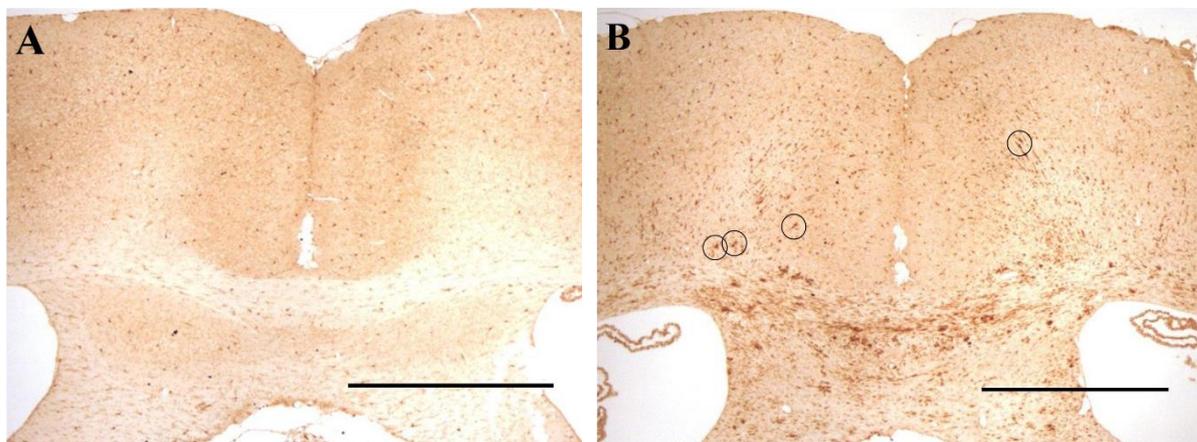


Abbildung 19: Anti-IBA1-Färbung. Übersichtsaufnahme. Zu sehen sind gegen IBA1 gefärbte Schnitte eines Kontroll- (A) und eines Versuchstieres (B). In A sieht man keine aktivierte Mikrogliazelle im Kortex. Im Vergleich dazu sind in B deutlich mehr aktivierte Mikrogliazellen im Kortex zu sehen (Kreise). Maßstabe = 500 μm .

3.2 Validierung der stereologischen Auswertung

Zunächst wurde überprüft, ob die angefertigte immunhistologische Färbung mit anti-NeuN eine gleichmäßige Färbung der Schnitte aufweist. Dies ist eine der Voraussetzungen, um ein valides Ergebnis zu erzielen. Hierfür wurden ein Kontroll- und ein Versuchstier (jeweils 9 Schnitte) untersucht und ausgewertet.

Die Abbildung 20 zeigt graphisch die Verteilung der NeuN⁺-Zellen innerhalb eines Schnitts. NeuN⁺-Zellen wurden nur innerhalb der UVCS (zwischen Mikrometer 3 und 17) gezählt. In der Sicherheitszone (Mikrometer 1 und 2) wurden keine Marker gesetzt. In Mikrometer 3 und 4 wiesen das Kontrolltier (Abb. 20A) und das Versuchstier (Abb. 20B) im Mittel eine geringere

Anzahl an NeuN⁺-Zellen als in den übrigen Bereichen auf. Ansonsten ist eine gleichmäßige Verteilung von NeuN⁺-Zellen im Kontroll- und im Versuchstier zu sehen.

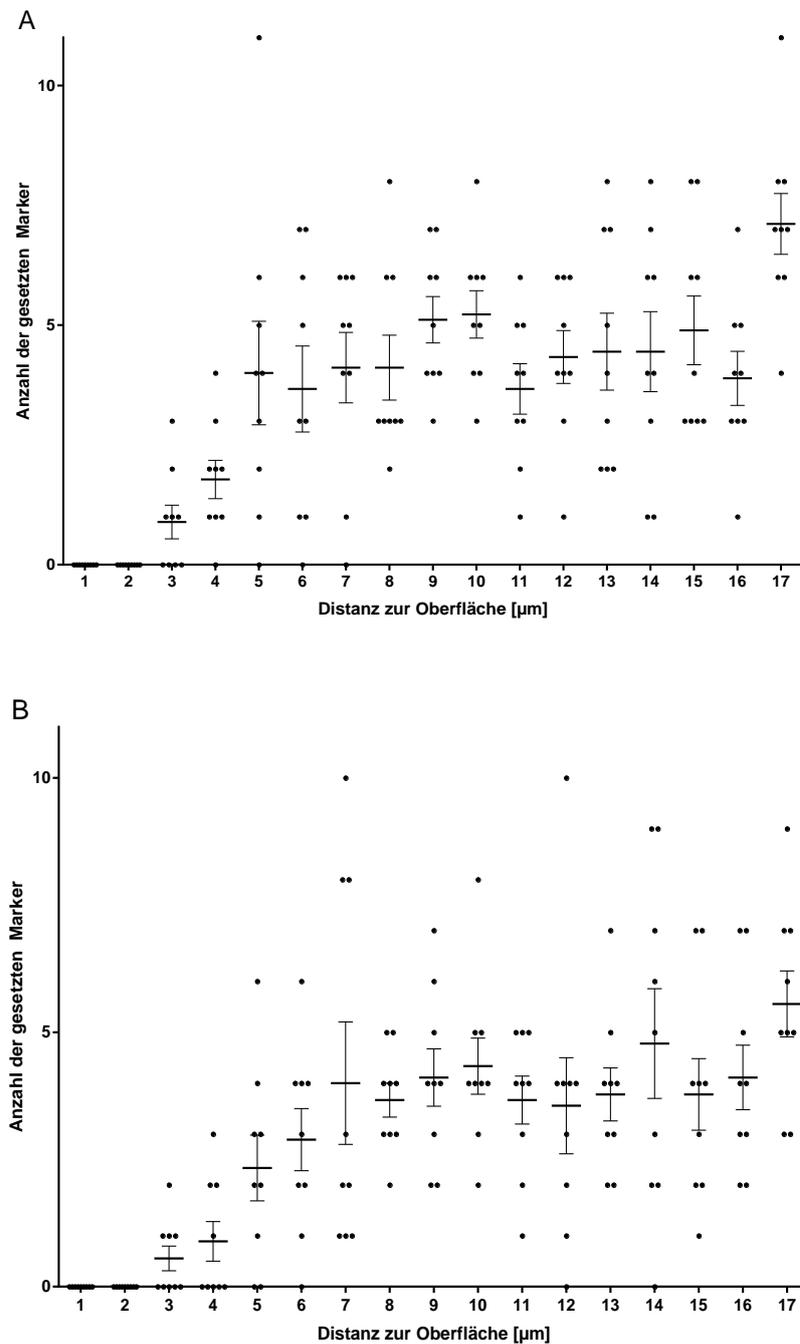


Abbildung 20: Ergebnis der Überprüfung der neu etablierten immunhistochemischen Färbung. Es ist die Anzahl der NeuN⁺-Zellen in Abhängigkeit ihrer Distanz zur Oberfläche dargestellt. (A) zeigt die Verteilung eines Kontrolltieres, (B) die eines Versuchstieres. Mikrometer 1 und 2 sind der Sicherheitsabstand, in dem keine Zellen gezählt wurden. In der Mitte des Schnitts zeigt sich bei beiden Tieren eine gleichmäßige Verteilung der NeuN⁺-Zellen.

3.3 Ergebnisse der stereologischen Auswertung

Da axonaler Schaden und Kortextrophie bei MS-Patienten bekannt sind, wurde zunächst die Kortextdicke gemessen und hinsichtlich einer signifikanten Atrophie untersucht. Im zweiten Schritt wurde die Neuronendichte bestimmt und auf eine signifikante Abnahme getestet.

3.3.1 Cuprizone-Intoxikation führt zu selektiver Kortextrophie

Die Kortextdicke wurde an zwei verschiedenen Stellen in zwei verschiedenen Regionen (Region 265 und Region 253 (Sidman 1971)) gemessen. Es wurden anti-NeuN gefärbte Kryoschnitte verwendet. Pro Schnitt wurde die Kortextdicke sowohl links als auch rechts gemessen und der Mittelwert gebildet. Insgesamt wurden sieben Kontroll- und sieben Versuchstiere untersucht. Zu stark beschädigte Schnitte, in denen nicht adäquat gemessen werden konnte, wurden ausgeschlossen (siehe Tab. 16 und 17).

In der Region 265 ergab die Messung der Kortextdicke am Messpunkt 1 (Abb. 21) keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 21). Am Messpunkt 2 in Region 265 (Abb. 21) zeigte sich eine signifikante Abnahme der Kortextdicke bei der Versuchsgruppe ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 22). Die einzelnen Messwerte sind in Tabelle 16 aufgeführt.

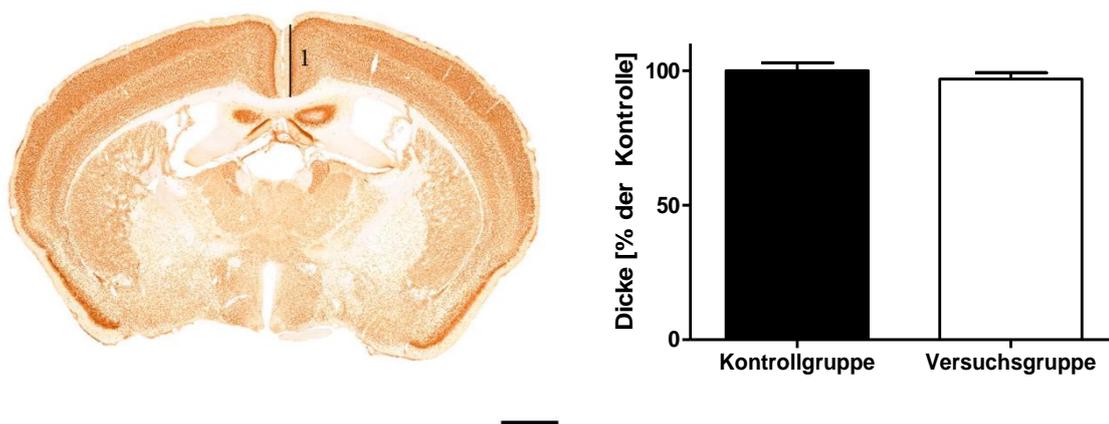


Abbildung 21: Messergebnisse der Kortextdicke am Messpunkt 1 in Region 265. Die Kortextdicke ist in Prozent angegeben. Die Versuchsgruppe weist keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ($p > 0,05$).

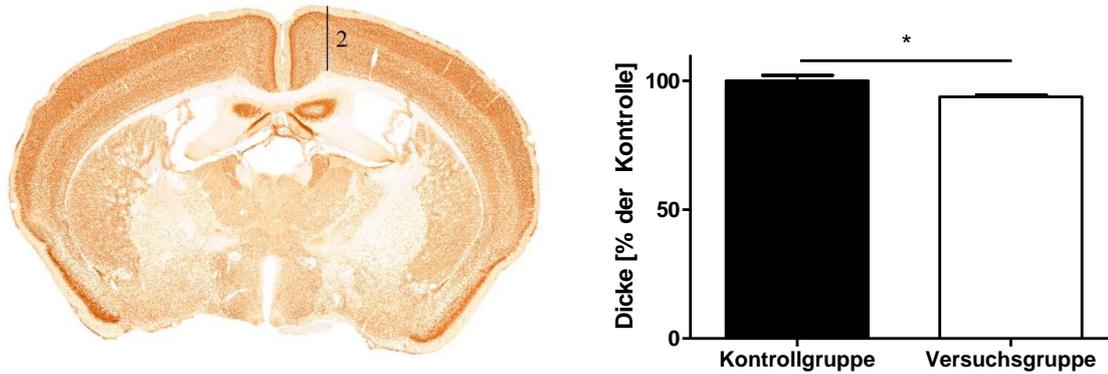


Abbildung 22: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 2 in Region 265. Die Kortexdicke ist in Prozent angegeben. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Kortexdicke der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Tabelle 16: Messergebnisse der Kortexdicke in Region 265 der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Es sind sowohl die Ergebnisse des Messpunktes 1 als auch des Messpunktes 2 angegeben. Die gemessenen Werte sind in μm angegeben. Zusätzlich wurden der Mittelwert und der Standardfehler (*engl: standard error of the mean = SEM*) berechnet.

Region 265		
Messpunkt 1	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
	Gemessene Werte [μm]	Gemessene Werte [μm]
Tier 1	1246,3	1135,4
Tier 2	1062,6	1201,6
Tier 3	1241,2	ausgeschlossen
Tier 4	1234,4	1108,0
Tier 5	1115,7	1061,0
Tier 6	1113,2	1260,0
Tier 7	1314,3	1143,9
Mittelwert	1189,7	1151,7

SEM	34,8	28,7
Messpunkt 2	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
	Gemessene Werte	Gemessene Werte
	[μm]	[μm]
Tier 1	1128,0	1011,4
Tier 2	1050,7	ausgeschlossen
Tier 3	1151,8	ausgeschlossen
Tier 4	1082,5	1046,6
Tier 5	1027,8	1003,9
Tier 6	1017,8	1012,0
Tier 7	1158,6	1026,9
Mittelwert	1088,2	1020,2
SEM	22,2	7,5

In Region 235 (Sidman 1971) konnte am Messpunkt 1 (Abb. 23) keine signifikante Kortextatrophie ($p > 0,05$) der Versuchsgruppe gegenüber den Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 23). Die Kortexdicke am Messpunkt 2 (Abb. 24) der Versuchsgruppe zeigte ebenfalls keine signifikante Abnahme ($p > 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 24). Die einzelnen Messdaten sind in Tabelle 17 aufgelistet.

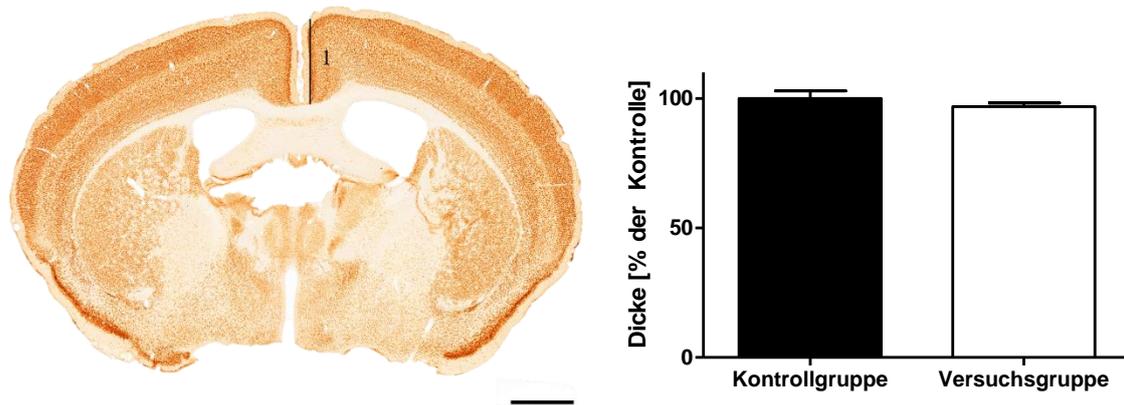


Abbildung 23: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 1 in Region 235. Die Kortexdicke ist in Prozent angegeben. Der schwarze Balken zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe, der weiße Balken die Ergebnisse der Versuchsgruppe. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe ($p > 0,05$).

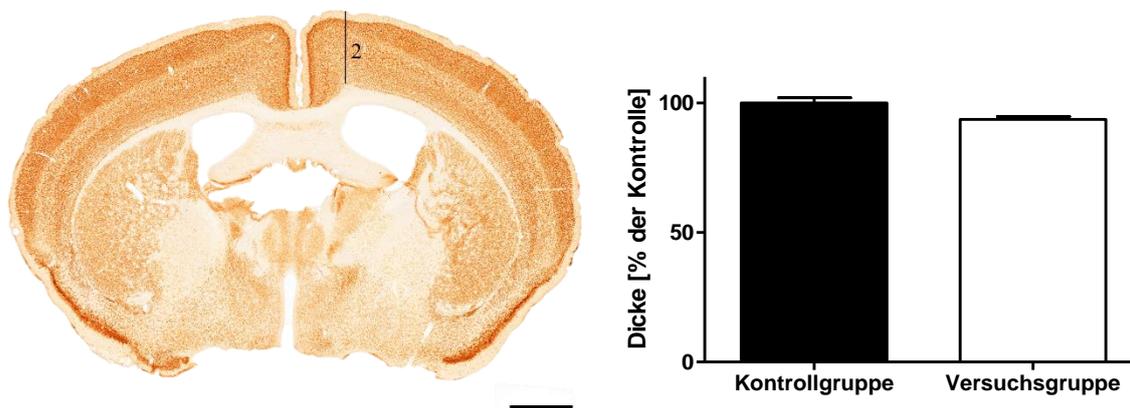


Abbildung 24: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 2 in Region 235. Die Kortexdicke ist in Prozent angegeben. Der schwarze Balken zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe, der weiße Balken die Ergebnisse der Versuchsgruppe. An dieser Messstelle war keine Abnahme der Kortexdicke der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe feststellbar ($p > 0,05$).

Tabelle 17: Messergebnisse der Kortexdicke in Region 235 der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Es sind sowohl die Ergebnisse des Messpunktes 1 als auch des Messpunktes 2 angegeben. Die gemessenen Werte sind in μm angegeben. Zusätzlich wurden der Mittelwert und der SEM berechnet.

Region 235	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
Messpunkt 1		
	Gemessene Werte [μm]	Gemessene Werte [μm]
Tier 1	1334,9	1204,7
Tier 2	1123,0	1237,7
Tier 3	1317,3	1265,1
Tier 4	1327,7	1187,2
Tier 5	1218,1	1143,5
Tier 6	1154,6	1281,6
Tier 7	1359,4	1234,1
Mittelwert	1262,1	1222,0
SEM	36,8	17,9
Messpunkt 2	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
	Gemessene Werte [μm]	Gemessene Werte [μm]
Tier 1	1191,2	1045,4
Tier 2	1072,2	ausgeschlossen

Tier 3	1206,6	1101,7
Tier 4	1164,7	1130,5
Tier 5	1129,7	1061,7
Tier 6	1088,8	1065,7
Tier 7	1236,5	1090,6
Mittelwert	1155,7	1082,6
SEM	23,2	12,7

Anschließend wurden die beiden Regionen zusammenfassend betrachtet. Auch hier zeigte sich am Messpunkt 1 kein signifikanter Unterschied in der Kortexdicke ($p > 0,05$, Abb. 25). Am Messpunkt 2 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Kortexdicke der Versuchsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p < 0,05$, Abb. 26).

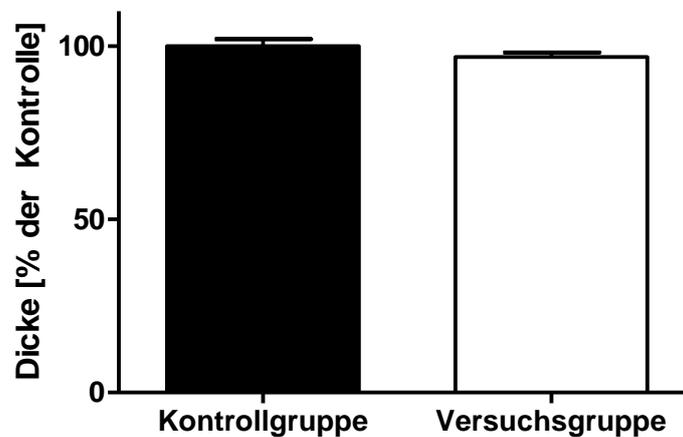


Abbildung 25: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 1. Die Regionen werden hier zusammenfassend betrachtet. Die Kortexdicke ist in Prozent angegeben. Der schwarze Balken zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe, der weiße Balken die Ergebnisse der Versuchsgruppe. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe ($p > 0,05$).

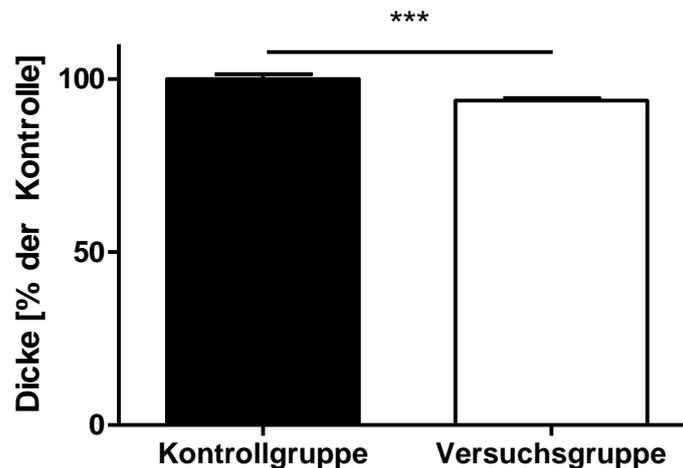


Abbildung 26: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 2. Die Regionen werden hier zusammenfassend betrachtet. Die Kortexdicke ist in Prozent angegeben. Der schwarze Balken zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe, der weiße Balken die Ergebnisse der Versuchsgruppe. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Kortexdicke der Versuchsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

3.3.2 Cuprizone-Intoxikation führt zu keiner signifikanten Veränderung der Neuronendichte

Nach Validierung der anti-NeuN-Immunhistochemie wurde die Dichte der anti-NeuN⁺-Zellen in der Lamina 6 des primär sensiblen Kortex in verschiedenen Regionen des Gehirns bestimmt. Es wurden insgesamt fünf benachbarte Regionen (R1-R5) untersucht. Es wurde untersucht, ob sich eine mögliche Veränderung der Neuronendichte auf einzelne Regionen des Gehirns beschränkt.

Bei der regional getrennten Auswertung zeigte sich in der Versuchsgruppe in fast allen Regionen eine niedrigere Dichte der NeuN⁺-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$, Abb. 27). Auch die einzelnen Regionen unterschieden sich untereinander nicht in Bezug auf die Neuronendichte.

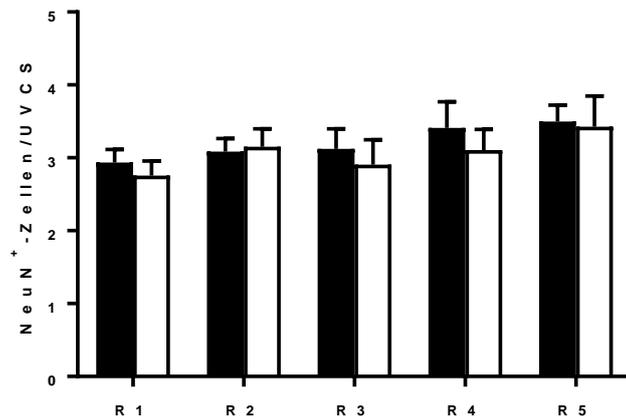


Abbildung 27: Dichte der NeuN⁺-Zellen der einzelnen Regionen R1-R5. Die Dichte wird als NeuN⁺-Zellen/UVCS angegeben. Die Versuchsgruppe (weiße Balken) weist im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarze Balken) keine geringere Dichte ($p > 0,05$) an NeuN⁺-Zellen in den einzelnen Regionen auf.

Im Weiteren wurde der gesamte Zählbereich (Lamina 6 des primär sensiblen Kortex zwischen Region 215 und 265 (Sidman 1971) betrachtet. Die Abbildung 28 zeigt die Dichte der NeuN⁺-Zellen der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe ($p > 0,05$).

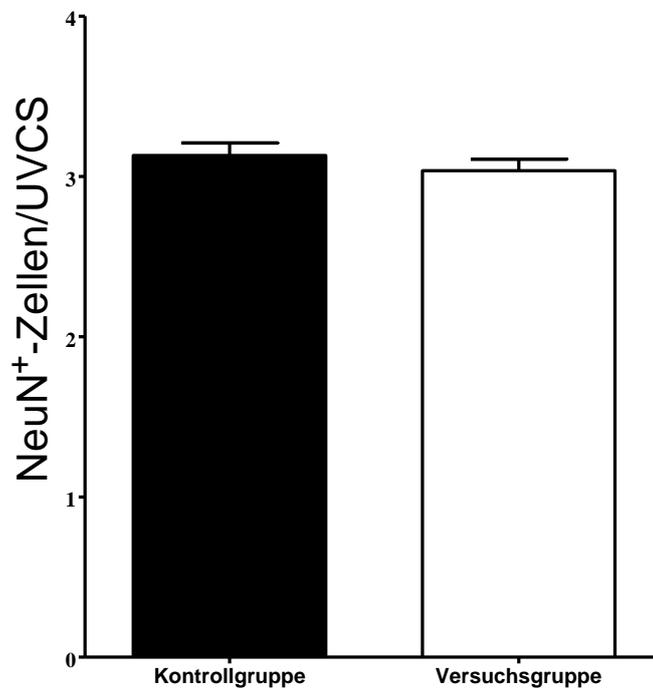


Abbildung 28: Dichte der NeuN⁺-Zellen des gesamten Zählbereichs. Die Dichte wird als NeuN⁺-Zellen/UVCS angegeben. Die Versuchsgruppe (weiße Balken) weist im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarze Balken) keine geringere Dichte ($p > 0,05$) an NeuN⁺-Zellen im Zählbereich auf.

4. Diskussion

Die MS ist eine chronisch-entzündliche demyelinisierende Erkrankung des ZNS mit einer multifaktoriellen Genese (Lucchinetti et al. 2000). Sie betrifft neben der weißen Substanz auch die graue Substanz des ZNS (Brownell and Hughes 1962). Demyelinisierungsherde sind sowohl im zerebralen Kortex, als auch in subkortikalen Bereichen wie dem Thalamus (Cifelli et al. 2002), dem Nucleus caudatus (Bermel et al. 2003) oder dem Hippocampus (Geurts et al. 2007) zu finden. Bei MS-Patienten zeigt sich mit zunehmender Erkrankungsdauer eine progrediente Atrophie des Gehirns. Die Pathogenese der Atrophie konnte bisher noch nicht geklärt werden (Coles et al. 1999; Losseff et al. 1996). Das Cuprizone-Modell wird häufig zur Erforschung der Pathogenese der MS verwendet. Cuprizone führt zu einer gut reproduzierbaren Demyelinisierung und axonalem Schaden (Kipp et al. 2017; Blakemore 1972; Irvine and Blakemore 2006). Die Forschungsansätze konzentrieren sich hierbei meist auf das Corpus callosum. Tabelle 18 gibt einen Überblick über Forschungsarbeiten, die eine Demyelinisierung im Kortex nachgewiesen haben. Im Vergleich dazu gibt es wenige Forschungsarbeiten, die Auswirkungen auf die Neurone im Kortex zeigen. Tabelle 19 gibt eine Übersicht über Forschungsarbeiten, die über neuronale Veränderungen im Kortex durch Cuprizone berichten.

Tabelle 18: Forschungsarbeiten über Demyelinisierung im Kortex im Cuprizone-Modell.

Titel mit Kernaussagen über kortikale Demyelinisierung	Autor (Jahr)	Journal
Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice - Die Anzahl degenerativer Oligodendrozyten im Kortex ist nach 2-wöchiger Cuprizone-Intoxikation am größten	(Blakemore 1972)	Journal of Neurocytology
Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent - Nach 4-wöchiger Cuprizone-Intoxikation kommt es zu zerebraler Demyelinisierung	(Skripuletz et al. 2008)	The American journal of pathology
Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination	(Gudi et al. 2009)	Brain research

<ul style="list-style-type: none"> - Die kortikale Demyelinisierung erreicht nach 6-wöchiger Cuprizone-Intoxikation sein Maximum 		
<p>Cuprizone-induced demyelination in CNP: GFP transgenic mice</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cuprizone führt zu Oligodendrozytenverlust im Kortex in genetisch veränderten Mäusen 	(Silvestroff et al. 2010)	The Journal of comparative neurology
<p>Inflammatory Response and Chemokine Expression in the White Matter Corpus Callosum and Gray Matter Cortex Region During Cuprizone-Induced Demyelination</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nach 3-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigt sich im sensiblen Kortex eine Demyelinisierung - Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigt sich eine nahezu vollständige Demyelinisierung im sensiblen Kortex 	(Buschmann et al. 2012)	Journal of molecular neuroscience
<p>Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions</p> <ul style="list-style-type: none"> - Die Cuprizone-induzierte kortikale Demyelinisierung korreliert mit der Mikrogliose 	(Clarner et al. 2012)	Glia
<p>The cuprizone model: regional heterogeneity of pathology</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eine Cuprizone-induzierte Demyelinisierung findet im Kortex früher statt als im Corpus callosum 	(Wergeland et al. 2012)	APMIS
<p>Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation kommt es zur Demyelinisierung im Kortex 	(Goldberg et al. 2015)	Journal of molecular neuroscience

Remyelination After Cuprizone-Induced Demyelination Is Accelerated in Juvenile Mice	(Pfeifenbring et al. 2015)	Journal of neuropathology and experimental neurology
<ul style="list-style-type: none"> - Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation ist die induzierte kortikale Demyelinisierung in juvenilen Mäusen ausgeprägter als in adulten Mäusen 		
Diffusion kurtosis imaging probes cortical alterations and white matter pathology following cuprizone induced demyelination and spontaneous remyelination	(Guglielmetti et al. 2016)	NeuroImage
<ul style="list-style-type: none"> - 6 Wochen nach 6-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigt sich in der Diffusions-Kurtosis-Bildgebung eine kortikale Demyelinisierung 		
Pathological changes in mice with long term cuprizone administration	(Nomura et al. 2019)	Neurochemistry international (2019)
<ul style="list-style-type: none"> - Es zeigt sich eine kortikale Demyelinisierung nach 12-wöchiger, 22-wöchiger und 34-wöchiger Cuprizone-Intoxikation 		
Cuprizone-induced oligodendrocyte loss and demyelination impairs recording performance of chronically implanted neural interfaces	(Wellman et al. 2020)	Biomaterials
<ul style="list-style-type: none"> - Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigt sich eine Demyelinisierung im visuellen Kortex 		

Tabelle 19: Forschungsarbeiten über neuronale Veränderungen im Kortex im Cuprizone-Modell.

Titel mit Kernaussagen über neuronale Veränderungen	Autor	Fachzeitschrift
Late Motor Decline After Accomplished Remyelination: Impact for Progressive Multiple Sclerosis	Manrique-Hoyos et al.	Annals of Neurology (2012)

<ul style="list-style-type: none"> - 28 Wochen nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigt sich weder eine Abnahme der Neuronenzahl noch der Neuronendichte im Kortex - 28 Wochen nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigt sich eine selektive kortikale Atrophie 		
Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination	Hochstrasser et. al	Cells (2019)
<ul style="list-style-type: none"> - Nach 12-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigt sich keine Abnahme der Anzahl oder der Dichte der NeuN⁺-Neurone im Kortex 		
Pathological changes in mice with long term cuprizone administration	Nomura et. al	Neurochemistry international (2019)
<ul style="list-style-type: none"> - Nach 34-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigt sich keine Abnahme der Anzahl der NeuN⁺-Neurone im Kortex 		

Diese Forschungsarbeiten geben erste Hinweise auf neurodegenerative Prozesse im Cuprizone-Modell. Keine dieser Arbeiten konnte aber eine Neurodegeneration mit validen Auswertmethoden nachweisen. Ziel dieser vorliegenden Arbeit war, die bisherige Forschung um die Fragestellung nach einer Kortexatrophie und einer Abnahme der Neuronendichte in diesem Bereich durch eine Cuprizone-induzierte Demyelinisierung zu erweitern. Hierfür wurde die Stereologie als „state-of-the-art“ Methode verwendet. Es zeigte sich eine selektive Kortexatrophie ohne eine Abnahme der Neuronendichte. Diese Erkenntnis und deren Bedeutung für die weitere MS-Forschung wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.1 Kortikale Atrophie als Surrogatmarker für den Krankheitsprogress

Erstmals konnte in dieser Studie mit validen Methoden gezeigt werden, dass im Cuprizone-Modell eine Kortexatrophie entsteht.

Bereits die Arbeitsgruppe um Manrique-Hoyos zeigte eine selektive kortikale Atrophie im Cuprizone-Modell. 28 Wochen nach der letzten Cuprizone-Gabe konnten sie eine Atrophie nachweisen. Als Auswertmethode wurde hier jedoch eine herkömmliche Methode verwendet und nicht die Stereologie als Goldstandardmethode. Ergänzend zu den Ergebnissen von Manrique-Hoyos konnten wir eine Atrophie bereits direkt im Anschluss an die Intoxikationszeit

nachweisen. Es konnte somit mit der Stereologie als Goldstandardmethode erstmals eindeutig gezeigt werden, dass eine akute Demyelinisierung zu einer regionalen kortikalen Atrophie führt. Im weiteren Verlauf wurde hierauf aufbauend eine ergänzende Studie durchgeführt, in der die kortikale Atrophie im Cuprizone-Modell nicht reproduziert werden konnte (Hochstrasser et al. 2019). Im Gegensatz zu unserer Studie wurde jedoch eine zum Teil weiter kaudal gelegene Region als ROI gewählt. Unsere Forschungsergebnisse zeigten regionale Unterschiede bezüglich einer kortikalen Atrophie, sodass sich in Zusammenschau der beiden genannten Studien und den hier vorliegenden Forschungsergebnissen der Hinweis auf eine regionale Vulnerabilität gegenüber Cuprizone ergibt. Dies zeigte sich auch in ergänzenden Versuchen von Hochstrasser et al. mit einer Intoxikationszeit mit Cuprizone über 12 Wochen. Hier konnte eine zerebrale Atrophie in den subkortikalen Regionen und des Corpus callosum nachgewiesen werden, jedoch keine Atrophie des zerebralen Kortex.

Eine Atrophie kortikaler sowie subkortikaler Regionen zeigt sich auch bei MS-Patienten (Eshaghi et al. 2018; Chu et al. 2018; Cifelli et al. 2002). Da die Ursachen der Atrophie bis dato noch ungeklärt sind, könnte die Atrophie als eine Koinzidenz ohne kausale Ursache für eine Krankheitsprogression gewertet werden. Studien an humanem Gewebe zeigten aber, dass die kortikale Atrophie kein diffuser Prozess ist, sondern in direktem Zusammenhang mit dem Krankheitsprogress steht (Steenwijk et al. 2016). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Ursache der Atrophie auch die Ursache der Krankheitsprogression ist. Sollte es gelingen, die Ursache der Atrophie benennen zu können, bieten sich hier potenzielle Ansatzpunkte für neuere und effektivere Medikamente, um die Krankheitsprogression zu unterbinden. Da nun erstmals im Cuprizone-Modell mit validen Methoden eine regionale Atrophie gezeigt werden konnte, bieten sich hier weitere Forschungsansätze, um die Ursachen der Atrophie weiter erforschen zu können.

4.2 Neuronenverlust im Cuprizone-Modell

Unsere Ergebnisse konnten keine Abnahme der neuronalen Dichte im sensiblen Kortex als Ursache für eine Atrophie detektieren. Im Gegensatz dazu konnte in einigen anderen Studien eine Abnahme bestimmter Zellpopulationen im Cuprizone-Modell beschrieben werden. In einer post-mortem Studie bei MS-Patienten wurden die Parvalbumin⁺-Interneurone im motorischen Kortex quantifiziert (Clements, McDonough, and Freeman 2008). Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Interneurone. Die Arbeitsgruppe um Tiwari-Woodruff wählte diesen Ansatz und konnten eine Abnahme von Parvalbumin⁺-Interneuronen im Hippocampus im Cuprizone-Modell zeigen (Lapato et al. 2017). Dies ergänzte die bereits bestehenden

Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe um Löscher. Löscher konnte eine geringere neuronale Dichte im Gyrus dentatus nach einer 12-wöchigen Cuprizone-Intoxikation feststellen (Hoffmann et al. 2008).

Während bei MS-Patienten eindeutig ein kortikaler Neuronenverlust gezeigt werden konnte (Peterson et al. 2001), gelang dies in unserer Studie nicht. Für weitere Forschungsansätze und Entwicklung neuroprotektiver Medikamente ist es essentiell, die Ursachen des Neuronenverlusts herauszufinden.

Die oben genannten Studien liefern wertvolle Ansätze, wie es gelingen könnte, eine Abnahme der Neuronendichte zu induzieren. Die genannten Studien haben im Vergleich eine deutlich längere Intoxikationszeit gewählt. Dieser Versuchsansatz wurde 2019 von unserer Arbeitsgruppe verfolgt. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass auch eine 12-wöchige Cuprizone-Intoxikation keine signifikante Abnahme der Neuronendichte erzielt (Hochstrasser et al. 2019). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die alleinige Demyelinisierung im Cuprizone-Modell möglicherweise nicht ausreicht, um einen kortikalen Neuronenverlust zu induzieren.

4.3 Limitationen von Tiermodellen

Tiermodelle werden häufig genutzt, um die Pathogenese einer Erkrankung zu untersuchen. Neben dem hier verwendeten Cuprizone-Modell gibt es weitere Modelle, beispielsweise das Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE-Modell). Beide Modelle sind etabliert und weit verbreitet. Jedes der Modelle hat seinen eigenen Schwerpunkt. Das EAE-Modell stellt vor allem immunvermittelte Prozesse dar. Das Cuprizone-Modell hingegen ist ein primär neurodegeneratives Modell.

Im Cuprizone-Modell spielt die immunologische Komponente eine untergeordnete Rolle, sodass neurodegenerative Prozesse unabhängig von Immunzellen untersucht werden können. Dies spiegelt insbesondere den chronischen Verlauf der MS wieder, da in diesem Stadium die Neurodegeneration weitestgehend unabhängig einer Inflammation voranschreitet. Im EAE-Modell werden immunbasiert akute Schübe induziert und bieten somit die Möglichkeit die schubförmige MS zu untersuchen. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass die schubbedingten Läsionen primär spinal, und nicht wie bei der MS, im Telencephalon entstehen. Mit der Wahl eines Tiermodells ist die daraus resultierende Arbeit also schon in sich limitiert, da entweder der neurodegenerative oder der immunologische Prozess berücksichtigt wird, und nicht wie bei der MS, beide Komponenten.

Zudem bilden diese Tiermodelle nur eine zeitlich begrenzte Episode der MS ab. Das EAE-Modell konzentriert sich auf die Abbildung von akuten Schüben auf die frühe Erkrankungsphase, während das Cuprizon-Modell mit einer chronischen Neurodegeneration eher die spätere Phase widerspiegelt. Hierdurch finden pathologische Prozesse, die zuvor oder später stattfinden, keine Berücksichtigung.

Insgesamt zeigt sich, dass Tiermodelle nicht in der Lage sind, alle Aspekte der MS abzubilden und es somit immer zu einer gewissen Limitierung kommt. Jedoch sind Tiermodelle aktuell nahezu alternativlos. Idealerweise würde man menschliches Gewebe untersuchen wollen. Allerdings stehen diese meist erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Erkrankung zur Verfügung. Somit lassen sich hier ebenfalls keine akuten Läsionen untersuchen.

Es zeigt sich also, dass Tiermodelle bis dato trotz ihrer entsprechenden Limitierung die beste Option darstellen. Die Wahl des Tiermodells will entsprechend der Fragestellung gut überlegt getroffen werden, je nach immunologischem oder neurodegenerativem Schwerpunkt. Hier liegt jedoch aber auch ein großer Vorteil der Tiermodelle. Es können einzelne Aspekte unabhängig von vielen weiteren Co-Faktoren untersucht werden. Somit liefern sie einen wertvollen Beitrag zur Erforschung der Pathogenese der MS und hierdurch wertvolle Ansätze für neuartige Therapieoptionen.

4.4 Antiinflammatorische und neuroprotektive Medikamente

Für die schubförmige MS gibt es eine Vielzahl an Medikamenten, beispielweise Glatirameracetat, Natalizumab oder Mitoxantron. Diese wirken wie die meisten Medikamente antiinflammatorisch oder immunmodulierend. Sie sind zur Prophylaxe von Schüben gut geeignet, konnten den Progress der Erkrankung jedoch nicht aufhalten oder gar verhindern. Des Weiteren sind diese Medikamente für den chronisch progredienten Verlauf nicht zugelassen, da sie hier keinen therapeutischen Effekt erzielen konnten.

Das bisher einzige für die sekundär chronisch progrediente MS zugelassene Medikament ist Siponimod. In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass durch Siponimod die Atrophie des Gehirns langsamer und weniger ausgeprägt voranschreitet (Kappos et al. 2018). Parallel dazu zeigte sich auch der klinische Progress weniger ausgeprägt. Hierdurch wird die hohe Relevanz der Gehirnatrophie in Bezug auf die klinische Krankheitsprogression deutlich sowie der Nutzen von neuroprotektiven Medikamenten. Wie in dieser Forschungsarbeit gezeigt werden konnte, wird im Cuprizon-Modell eine Atrophie induziert. Für weitere Forschungsarbeiten bietet sich hier die Möglichkeit, die Progredienz sowie die räumliche

Verteilung der Atrophie weiter zu untersuchen und somit Rückschlüsse auf Ursachen der Atrophie ziehen zu können. Inwiefern ein neuronaler Verlust und weitere neurodegenerative Prozesse die Atrophie verursachen, bleibt abzuwarten. Je mehr Wissen über die Atrophie und deren Ursache gewonnen werden kann, desto präziser können neuroprotektive Medikamente entwickelt und der Krankheitsprogress der MS verringert werden.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Trotz intensiver Studien ist bis heute die genaue Pathogenese dieser Erkrankung nicht eindeutig geklärt. Es lässt sich jedoch bei zunehmender Erkrankungsdauer eine Atrophie des Gehirns beobachten. Für die Erforschung der Erkrankung stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. In dieser Studie wurde das toxische Cuprizone-Modell verwendet. Cuprizone führt bei Mäusen zu einer gut reproduzierbaren Demyelinisierung im Corpus callosum und im Kortex, ohne eine relevante Beteiligung peripherer Immunzellen.

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe einer Goldstandardmethode („design-based“ Stereologie) im Cuprizone-Modell die Fragen nach einer Kortexatrophie sowie einer Abnahme der Neuronendichte unter Ausschluss von peripheren Immunzellen als histopathologisches Korrelat einer Krankheitsprogredienz zu beantworten.

Material und Methoden: Die verwendeten Tiere wurden randomisiert auf eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Versuchsgruppe erhielt über einen Zeitraum von 5 Wochen 0,25% Cuprizone-haltiges Futter. Anschließend wurden die Tiere transkardial perfundiert und kryoprotectiert. Die immunhistologische Anfärbung erfolgte mit dem Neuronal Nuclei-Antikörper. Die Auswertung erfolgte mittels der Stereologie. Als Untersuchungsbereich wurde die Lamina 6 des primär sensiblen Kortex in Region 215-265 (Sidman 1971) festgelegt.

Ergebnisse: Die Untersuchung der Kortexdicke zeigte bei der Versuchsgruppe eine selektive Atrophie im Bereich des Kortex im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung der Neuronendichte ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe.

Diskussion und Ausblick: Atrophie scheint ein wichtiger Faktor des Krankheitsprogress der MS zu sein. Mit dem erstmaligen Nachweis einer kortikalen Atrophie im Cuprizone-Modell mit einer Goldstandardmethode bieten sich viele weitere Optionen für die weitere Erforschung der Ursachen der Atrophie. Dies bietet die Basis, um in zukünftigen Studien neuroprotektive Medikamente zu entwickeln, um den Krankheitsprogress zu stoppen. Durch die hier vorliegenden Forschungsergebnisse konnte ein erster wichtiger Schritt zur weiteren Erforschung der Pathogenese sowie der Entwicklung dieser Medikamente geleistet werden.

Quellen

- Andersen, B. B., and H. J. Gundersen. 1999. 'Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections', *J Microsc*, 196: 69-73.
- Barnett, M. H., and J. W. Prineas. 2004. 'Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion', *Ann Neurol*, 55: 458-68.
- Bermel, R. A., M. D. Innus, C. W. Tjoa, and R. Bakshi. 2003. 'Selective caudate atrophy in multiple sclerosis: a 3D MRI parcellation study', *Neuroreport*, 14: 335-9.
- Blakemore, W. F. 1972. 'Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice', *J Neurocytol*, 1: 413-26.
- . 1973. 'Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone', *J Neurol Sci*, 20: 73-83.
- Boison, D., H. Büssov, D. D'Urso, H. W. Müller, and W. Stoffel. 1995. 'Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths', *J Neurosci*, 15: 5502-13.
- Brownell, B., and J. T. Hughes. 1962. 'The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 25: 315-20.
- Buschmann, J. P., K. Berger, H. Awad, T. Clarner, C. Beyer, and M. Kipp. 2012. 'Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination', *J Mol Neurosci*, 48: 66-76.
- Carlton, W. W. 1966. 'Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone', *Toxicol Appl Pharmacol*, 8: 512-21.
- Chu, R., G. Kim, S. Tauhid, F. Khalid, B. C. Healy, and R. Bakshi. 2018. 'Whole brain and deep gray matter atrophy detection over 5 years with 3T MRI in multiple sclerosis using a variety of automated segmentation pipelines', *PLoS One*, 13: e0206939.
- Cifelli, A., M. Arridge, P. Jezard, M. M. Esiri, J. Palace, and P. M. Matthews. 2002. 'Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis', *Ann Neurol*, 52: 650-3.
- Clarner, T., F. Diederichs, K. Berger, B. Denecke, L. Gan, P. van der Valk, C. Beyer, S. Amor, and M. Kipp. 2012. 'Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions', *Glia*, 60: 1468-80.
- Clements, R. J., J. McDonough, and E. J. Freeman. 2008. 'Distribution of parvalbumin and calretinin immunoreactive interneurons in motor cortex from multiple sclerosis post-mortem tissue', *Exp Brain Res*, 187: 459-65.
- Coles, A. J., M. G. Wing, P. Molyneux, A. Paolillo, C. M. Davie, G. Hale, D. Miller, H. Waldmann, and A. Compston. 1999. 'Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis', *Ann Neurol*, 46: 296-304.
- Confavreux, C., S. Vukusic, T. Moreau, and P. Adeleine. 2000. 'Relapses and progression of disability in multiple sclerosis', *N Engl J Med*, 343: 1430-8.
- Draheim, T., A. Liessem, M. Scheld, F. Wilms, M. Weissflog, B. Denecke, T. W. Kensler, A. Zendedel, C. Beyer, M. Kipp, C. J. Wruck, A. Fragoulis, and T. Clarner. 2016. 'Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model', *Glia*, 64: 2219-30.
- Eshaghi, A., R. V. Marinescu, A. L. Young, N. C. Firth, F. Prados, M. Jorge Cardoso, C. Tur, F. De Angelis, N. Cawley, W. J. Brownlee, N. De Stefano, M. Laura Stromillo, M. Battaglini, S. Ruggieri, C. Gasperini, M. Filippi, M. A. Rocca, A. Rovira, J. Sastre-Garriga, J. J. G. Geurts, H. Vrenken, V. Wottschel, C. E. Leurs, B. Uitdehaag, L. Pirpamer, C. Enzinger, S. Ourselin, C. A. Gandini Wheeler-Kingshott, D. Chard, A. J.

- Thompson, F. Barkhof, D. C. Alexander, and O. Ciccarelli. 2018. 'Progression of regional grey matter atrophy in multiple sclerosis', *Brain*, 141: 1665-77.
- Fisher, E., J. C. Lee, K. Nakamura, and R. A. Rudick. 2008. 'Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study', *Ann Neurol*, 64: 255-65.
- Frischer, J. M., S. Bramow, A. Dal-Bianco, C. F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen, and H. Lassmann. 2009. 'The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains', *Brain*, 132: 1175-89.
- Geurts, J. J., L. Bo, S. D. Roosendaal, T. Hazes, R. Daniels, F. Barkhof, M. P. Witter, I. Huitinga, and P. van der Valk. 2007. 'Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis', *J Neuropathol Exp Neurol*, 66: 819-27.
- Gilmore, C. P., L. Bo, T. Owens, J. Lowe, M. M. Esiri, and N. Evangelou. 2006. 'Spinal cord gray matter demyelination in multiple sclerosis-a novel pattern of residual plaque morphology', *Brain Pathol*, 16: 202-8.
- Goldberg, J., T. Clarner, C. Beyer, and M. Kipp. 2015. 'Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice', *J Mol Neurosci*, 57: 166-75.
- Gudi, V., D. Moharreggh-Khiabani, T. Skripuletz, P. N. Koutsoudaki, A. Kotsiari, J. Skuljec, C. Trebst, and M. Stangel. 2009. 'Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination', *Brain Res*, 1283: 127-38.
- Guglielmetti, C., J. Veraart, E. Roelant, Z. Mai, J. Daans, J. Van Audekerke, M. Naeyaert, G. Vanhoutte, Y. Palacios R. Delgado, J. Praet, E. Fieremans, P. Ponsaerts, J. Sijbers, A. Van der Linden, and M. Verhoye. 2016. 'Diffusion kurtosis imaging probes cortical alterations and white matter pathology following cuprizone induced demyelination and spontaneous remyelination', *Neuroimage*, 125: 363-77.
- Gundersen, H. J. 1986. 'Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson', *J Microsc*, 143: 3-45.
- Gundersen, H. J., and E. B. Jensen. 1987. 'The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction', *J Microsc*, 147: 229-63.
- Hamada, M. S., and M. H. Kole. 2015. 'Myelin loss and axonal ion channel adaptations associated with gray matter neuronal hyperexcitability', *J Neurosci*, 35: 7272-86.
- Hauser, S. L., and J. R. Oksenberg. 2006. 'The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration', *Neuron*, 52: 61-76.
- Hiremath, M. M., V. S. Chen, K. Suzuki, J. P. Ting, and G. K. Matsushima. 2008. 'MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells', *J Neuroimmunol*, 203: 23-32.
- Hochstrasser, Tanja, Sebastian Rühling, Kerstin Hecher, Kai H. Fabisch, Uta Chrzanowski, Matthias Brendel, Florian Eckenweber, Christian Sacher, Christoph Schmitz, and Markus Kipp. 2019. 'Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination', *Cells*, 8: 1024.
- Hoffmann, K., M. Lindner, I. Groticke, M. Stangel, and W. Loscher. 2008. 'Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice', *Exp Neurol*, 210: 308-21.
- Irvine, K. A., and W. F. Blakemore. 2006. 'Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice', *J Neuroimmunol*, 175: 69-76.
- Jacobs, L., J. O'Malley, A. Freeman, and R. Ekes. 1981. 'Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis', *Science*, 214: 1026-8.
- Kappos, L., A. Bar-Or, B. A. C. Cree, R. J. Fox, G. Giovannoni, R. Gold, P. Vermersch, D. L. Arnold, S. Arnould, T. Scherz, C. Wolf, E. Wallström, and F. Dahlke. 2018. 'Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study', *Lancet*, 391: 1263-73.

- Kipp, M., S. Nyamoya, T. Hochstrasser, and S. Amor. 2017. 'Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective', *Brain Pathol*, 27: 123-37.
- Lapato, A. S., J. I. Szu, J. P. C. Hasselmann, A. J. Khalaj, D. K. Binder, and S. K. Tiwari-Woodruff. 2017. 'Chronic demyelination-induced seizures', *Neuroscience*, 346: 409-22.
- Losseff, N. A., L. Wang, H. M. Lai, D. S. Yoo, M. L. Gawne-Cain, W. I. McDonald, D. H. Miller, and A. J. Thompson. 1996. 'Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis. A serial MRI study', *Brain*, 119 (Pt 6): 2009-19.
- Lublin, F. D., and S. C. Reingold. 1996. 'Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis', *Neurology*, 46: 907-11.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, and H. Lassmann. 2000. 'Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination', *Ann Neurol*, 47: 707-17.
- Mayhew, T. M. 1991. 'The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs', *Exp Physiol*, 76: 639-65.
- Miller, D. H., and S. M. Leary. 2007. 'Primary-progressive multiple sclerosis', *Lancet Neurol*, 6: 903-12.
- Morell, P., C. V. Barrett, J. L. Mason, A. D. Toews, J. D. Hostettler, G. W. Knapp, and G. K. Matsushima. 1998. 'Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination', *Mol Cell Neurosci*, 12: 220-7.
- Nave, K. A., C. Lai, F. E. Bloom, and R. J. Milner. 1987. 'Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 5665-9.
- Nomura, T., Y. Bando, H. Nakazawa, S. Kanemoto, and S. Yoshida. 2019. 'Pathological changes in mice with long term cuprizone administration', *Neurochem Int*, 126: 229-38.
- Peterson, J. W., L. Bo, S. Mork, A. Chang, and B. D. Trapp. 2001. 'Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions', *Ann Neurol*, 50: 389-400.
- Pfeifenbring, S., S. Nessler, C. Wegner, C. Stadelmann, and W. Brück. 2015. 'Remyelination After Cuprizone-Induced Demyelination Is Accelerated in Juvenile Mice', *J Neuropathol Exp Neurol*, 74: 756-66.
- Prineas, J. W., E. E. Kwon, E. S. Cho, L. R. Sharer, M. H. Barnett, E. L. Oleszak, B. Hoffman, and B. P. Morgan. 2001. 'Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis', *Ann Neurol*, 50: 646-57.
- Puelles, V. G., R. N. Douglas-Denton, L. Cullen-McEwen, B. J. McNamara, F. Salih, J. Li, M. D. Hughson, W. E. Hoy, J. R. Nyengaard, and J. F. Bertram. 2014. 'Design-based stereological methods for estimating numbers of glomerular podocytes', *Ann Anat*, 196: 48-56.
- Raine, C. S., and A. H. Cross. 1989. 'Axonal dystrophy as a consequence of long-term demyelination', *Lab Invest*, 60: 714-25.
- Schmitz, C., and P. R. Hof. 2000. 'Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach', *J Chem Neuroanat*, 20: 93-114.
- . 2005. 'Design-based stereology in neuroscience', *Neuroscience*, 130: 813-31.
- Sidman, R., Angevine, J., Pierce, E. 1971. *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*.
- Silvestroff, L., S. Bartucci, E. Soto, V. Gallo, J. Pasquini, and P. Franco. 2010. 'Cuprizone-induced demyelination in CNP::GFP transgenic mice', *J Comp Neurol*, 518: 2261-83.
- Skripuletz, T., M. Lindner, A. Kotsiari, N. Garde, J. Fokuhl, F. Linsmeier, C. Trebst, and M. Stangel. 2008. 'Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent', *Am J Pathol*, 172: 1053-61.

- Steenwijk, M. D., J. J. Geurts, M. Daams, B. M. Tijms, A. M. Wink, L. J. Balk, P. K. Tewarie, B. M. Uitdehaag, F. Barkhof, H. Vrenken, and P. J. Pouwels. 2016. 'Cortical atrophy patterns in multiple sclerosis are non-random and clinically relevant', *Brain*, 139: 115-26.
- Thompson, A. J., S. E. Baranzini, J. Geurts, B. Hemmer, and O. Ciccarelli. 2018. 'Multiple sclerosis', *Lancet*, 391: 1622-36.
- Trapp, B. D., and K. A. Nave. 2008. 'Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?', *Annu Rev Neurosci*, 31: 247-69.
- Trapp, B. D., J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mork, and L. Bo. 1998. 'Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis', *N Engl J Med*, 338: 278-85.
- Wagenknecht, N., B. Becker, M. Scheld, C. Beyer, T. Clarner, T. Hochstrasser, and M. Kipp. 2016. 'Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models', *J Mol Neurosci*, 60: 102-14.
- Wellman, S. M., K. Guzman, K. C. Stieger, L. E. Brink, S. Sridhar, M. T. Dubaniewicz, L. Li, F. Cambi, and T. D. Y. Kozai. 2020. 'Cuprizone-induced oligodendrocyte loss and demyelination impairs recording performance of chronically implanted neural interfaces', *Biomaterials*, 239: 119842.
- Wergeland, S., Ø Torkildsen, K. M. Myhr, S. J. Mørk, and L. Bø. 2012. 'The cuprizone model: regional heterogeneity of pathology', *Apmis*, 120: 648-57.
- West, M. J. 1993. 'New stereological methods for counting neurons', *Neurobiol Aging*, 14: 275-85.
- West, M. J., K. Ostergaard, O. A. Andreassen, and B. Finsen. 1996. 'Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: an in situ hybridization study using the optical fractionator method', *J Comp Neurol*, 370: 11-22.
- West, M. J., L. Slomianka, and H. J. Gundersen. 1991. 'Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator', *Anat Rec*, 231: 482-97.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer ROI.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Zählbereiches eines Schnittes.....	5
Abbildung 3: Gegenüberstellung zweier Gewebe mit unterschiedlich großen Zellen (schematische Darstellung).....	6
Abbildung 4: Gegenüberstellung zweier Gewebe mit unterschiedlich ausgerichteten Zellen (schematische Darstellung).....	6
Abbildung 5: Gegenüberstellung zweier Gewebe mit unterschiedlichem Volumen (schematische Darstellung).....	7
Abbildung 6: Gewebe mit Zellen und Zählkriterium (schematische Darstellung).	8
Abbildung 7: Zählrahmen mit Ein- und Ausschlusslinien (schematische Darstellung).....	9
Abbildung 8: Vergleich zweier Schnitte unter Anwendung der Sicherheitszone (schematische Darstellung).	9
Abbildung 9: Region 215 (Sidman 1971) in der Frontalansicht.	19
Abbildung 10: Region 265 (Sidman 1971) in der Frontalansicht.	20
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung.	22
Abbildung 12: Repräsentative anti-NeuN-gefärbte Schnitte der Regionen, in denen die Kortexdicke gemessen wurde.	27
Abbildung 13: Repräsentativer anti-NeuN-gefärbter Schnitt der Region 265, in der die Kortexdicke gemessen wurde.	28
Abbildung 14: Unterschiedliche Fokusebenen desselben Schnitts mit Gitter (200 µm x 200 µm) und Zählrahmen (30 µm x 30 µm).	30
Abbildung 15: Anti-NeuN-gefärbter Schnitt mit eingezeichnetem Untersuchungsbereich.	31
Abbildung 16: Anti-PLP-Färbungen, repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum.....	33
Abbildung 17: Anti-PLP-Färbungen. Übersichtsaufnahmen.	34
Abbildung 18: Anti-IBA1-Färbungen, repräsentative Ausschnitte des medialen Corpus callosum.....	35
Abbildung 19: Anti-IBA1-Färbung. Übersichtsaufnahme.	35
Abbildung 20: Ergebnis der Überprüfung der neu etablierten immunhistochemischen Färbung.	36
Abbildung 21: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 1 in Region 265.....	37
Abbildung 22: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 2 in Region 265.....	38
Abbildung 23: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 1 in Region 235.....	40

Abbildung 24: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 2 in Region 235.....	40
Abbildung 25: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 1.	42
Abbildung 26: Messergebnisse der Kortexdicke am Messpunkt 2.	43
Abbildung 27: Dichte der NeuN ⁺ -Zellen der einzelnen Regionen R1-R5.	44
Abbildung 28: Dichte der NeuN ⁺ -Zellen des gesamten Zählbereichs.	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispielrechnung von drei Auszählungen mit Schätzung der Gesamtzellzahl und Mittelwert; geringe Streubreite.....	11
Tabelle 2: Beispielrechnung von drei Auszählungen mit Schätzung der Gesamtzellzahl und Mittelwert; höhere Streubreite.....	11
Tabelle 3: Laborinterne Bezeichnung der Tiere, deren Versuchszugehörigkeit und verwendete Färbungen.....	13
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.....	14
Tabelle 5: Verwendete Materialien.....	16
Tabelle 6: Protokoll zu Herstellung von Paraformaldehyd.....	17
Tabelle 7: Lösungen und Arbeitsschritte für die Kryoprotektion.....	18
Tabelle 8: Arbeitsschritte der Paraffineinbettung.....	20
Tabelle 9: Protokoll zur Herstellung von 0,5 %-igen Gelatine-Objektträgern.....	21
Tabelle 10: Protokoll zur Herstellung der für die immunhistochemischen Färbung benötigten Chemikalien.....	23
Tabelle 11: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung mit anti-NeuN.....	24
Tabelle 12: Protokoll zur Herstellung der Lösungen für die anti-IBA1- und anti-PLP-Färbungen.....	25
Tabelle 13: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung mit anti-IBA1 und anti-PLP.....	26
Tabelle 14: Parameter für die Verwendung des stereologischen Arbeitsplatzes.....	29
Tabelle 15: Unterteilung des Zählbereichs Region 215-265 (Sidman 1971).....	30
Tabelle 16: Messergebnisse der Kortexdicke in Region 265 der Kontroll- und der Versuchsgruppe.....	38
Tabelle 17: Messergebnisse der Kortexdicke in Region 235 der Kontroll- und der Versuchsgruppe.....	41
Tabelle 18: Forschungsarbeiten über Demyelinisierung im Kortex im Cuprizone-Modell....	45
Tabelle 19: Forschungsarbeiten über neuronale Veränderungen im Kortex im Cuprizone-Modell.....	47

Danksagung

Hiermit möchte ich allen Menschen danken, die diese Promotionsarbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Zuallererst gilt mein größter Dank meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Markus Kipp, für die Überlassung des Themas und für die Betreuung der Arbeit und die damit verbundene Unterstützung und Geduld.

Herrn Prof. Dr. Schmitz, dass ich diese Promotion an seinem Lehrstuhl verfassen durfte.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Tanja Hochstrasser, die mich mit ihrer Hilfsbereitschaft und mit großer Geduld in diesem Vorhaben unterstützt hat. Bei offenen Fragen konnte ich mich stets auf eine rasche und kompetente Antwort verlassen.

Unmöglich wäre das Projekt ohne die hervorragende Hilfe durch die technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter im Labor gewesen. Insbesondere Beate Aschauer, Astrid Baltruschat und Sarah Wübbel haben mich mit viel Geduld in die technische Arbeit im Labor eingeführt und sind stets mit mir auf Fehlersuche gegangen.

Zudem gilt ein großer Dank meinem Mann Florian, sowie meinen Freunden, „alten“ und neu Gewonnenen im Labor. Zu guter Letzt ein großes Dankeschön an meine Familie, insbesondere an meine Mutter, die mir mit ihrem Vertrauen in mich alle Türen geöffnet hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

Veränderungen der Kortexdicke und Neuronendichte im Multiple Sklerose Cuprizone-Modell

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

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

Billerbeck, 15.03.2022

Ort, Datum

C. Roggenkamp

Unterschrift