

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II - Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Christoph Schmitz



Astrozytenheterogenität in Multiple Sklerose-Tiermodellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Gesine Fricke

aus

Leer (Ostfriesland)

2022

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

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Nelson

Priv. Doz. Dr. med. Joachim Havla

Mitbetreuung durch den
promovierten Betreuer:

Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

17.03.2022

Für M., P. und W.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	4
II. Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Die Multiple Sklerose	8
1.2 Das Cuprizone-Modell	9
1.3 Astrozyten	11
1.4 Astrozytenmarker	13
1.4.1 GFAP	13
1.4.2 ADLH1L1	15
1.4.3 Vimentin.....	16
1.4.4 BLBP.....	17
1.4.5 S100 β	18
1.5 Fragestellung	20
2. Materialien	21
3. Methoden	27
3.1 Versuchstiere und Tierhaltung	27
3.2 Durchführung der Versuche und Materialgewinnung	27
3.3 Immunhistochemische Färbung	30
3.3.1 Prinzip.....	30
3.3.2 Durchführung.....	31
3.3.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung	34
3.4 Immunfluoreszenzfärbung	36
3.4.1 Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung.....	36
3.4.2 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung.....	37
3.4.3 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung.....	40
3.4 Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	42
4.1 Erhöhte GFAP-Expression in neokortikalen Astrozyten und Astrozyten der weißen Substanz nach Toxin-induzierter Demyelinisierung	42
4.2 Erhöhte ADLH1L1-Expression in Astrozyten der weißen Substanz nach Toxin-induzierter Demyelinisierung	44

4.3 Kolokalisation von ADLH1L1 und GFAP in Astrozyten nach Toxin-induzierter Demyelinisierung.....	46
4.4 Erhöhte Vimentin-Expression in archi- und neokortikalen Astrozyten und Astrozyten der weißen Substanz nach Toxin-induzierter Demyelinisierung.....	48
4.5 Erhöhte BLBP-Expression in Astrozyten der weißen Substanz und Astrozyten tiefer neokortikaler Schichten nach Toxin-induzierter Demyelinisierung.....	50
4.6 Keine erhöhte S100 β -Expression in Astrozyten nach Toxin-induzierter Demyelinisierung.....	52
5. Diskussion	54
5.1 Astrozyten und ihre Rolle in der Pathogenese der MS	54
5.2 Astrozyten sind eine heterogene Zellpopulation im Cuprizone-Modell	55
6. Zusammenfassung.....	65
III. Tabellenverzeichnis	66
IV. Abbildungsverzeichnis.....	67
V. Eidesstattliche Versicherung.....	68
VI. Danksagung.....	69
VII. Literaturverzeichnis	70

II. Abkürzungsverzeichnis

§	Paragraph
%	Prozent
°C	Grad Celsius
ALDH1L1	Aldehyd-Dehydrogenase 1 family member L1
BLBP	Brain lipid-binding protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzidin
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al	et alia
FABP	Fatty acid-binding protein
FABP7	Fatty acid-binding protein 7
FTHF	Formyltetrahydrofolat
FTHFD	Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase
g	Gramm
GFAP	Saure Gliafaserprotein
GLAST	Glutamat Aspartat Transporter
GLT1	Glutamat Transporter 1
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HHV	Humanes Herpes Virus
HIER	Heat-induced-epitope-retrieval
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA-DRB1*15:01	Humanes Leukozyten Antigen DRB1*15:01
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish-Peroxidase)
IL2RA	Interleukin-2 Rezeptor Alpha Kette
IL7RA	Interleukin-7-Rezeptor Alpha Kette
kDa	Kilodalton
L	Liter
LCC	laterales Corpus callosum
LPS	Lipopolysaccharid
MCC	mediales Corpus callosum
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
OT	Objektträger
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphatpufferlösung
PPMS	Primär-progrediente MS (engl. primary progressive MS)
pScx	Primär somatosensorischer Kortex
RRMS	Schubförmig-remittierende MS (engl. relapsing-remitting MS)
ROI	Region of interest
sec	Sekunden
SEM	Standard Error of the Mean
SPMS	Sekundär-progrediente MS (engl. secondary-progressive MS)
TierSchG	Tierschutzgesetz
THF	Tetrahydrofolat
USA	United States of America
Vim	Vimentin
ZNS	Zentralnervensystem
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (Encephalomyelitis disseminata, MS) ist eine erworbene, chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Sie äußert sich durch Ausbildung entzündlicher Läsionen in der weißen und grauen Substanz, welche abhängig von ihrer Lokalisation zu neurologischen Ausfällen führen können.

Weltweit sind etwa zwei Millionen Menschen von MS betroffen, zudem stellt sie die häufigste neurologische Erkrankung unter jungen Erwachsenen dar (Kingwell et al., 2013). Die Prävalenz unterliegt einer starken geographischen Varianz. Die höchsten Prävalenzen finden sich in Europa und Nordamerika mit über 100 MS-Erkrankten auf 100.000 Einwohner (Multiple Sclerosis International Federation, 2013). Frauen sind dreimal häufiger als Männer von MS betroffen und das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 30 Jahren (Koch-Henriksen & Sørensen, 2010).

Die Klassifikation der MS erfolgt grob in drei verschiedene Verlaufsformen:

Bei über 80 % der Patienten beginnt die Erkrankung mit einem schubförmig-remittierenden Verlauf (RRMS). Neurologische Defizite treten dabei im Rahmen von Schüben auf, die sich vollständig oder unvollständig zurückbilden können. Meist kommt es im Verlauf zu einer Transformation der Erkrankung in die sekundär progressive Form der MS (SPMS). Bei etwa 15 % der Betroffenen wird zu Beginn die primär progrediente MS diagnostiziert (PPMS). Diese Patienten zeigen eine

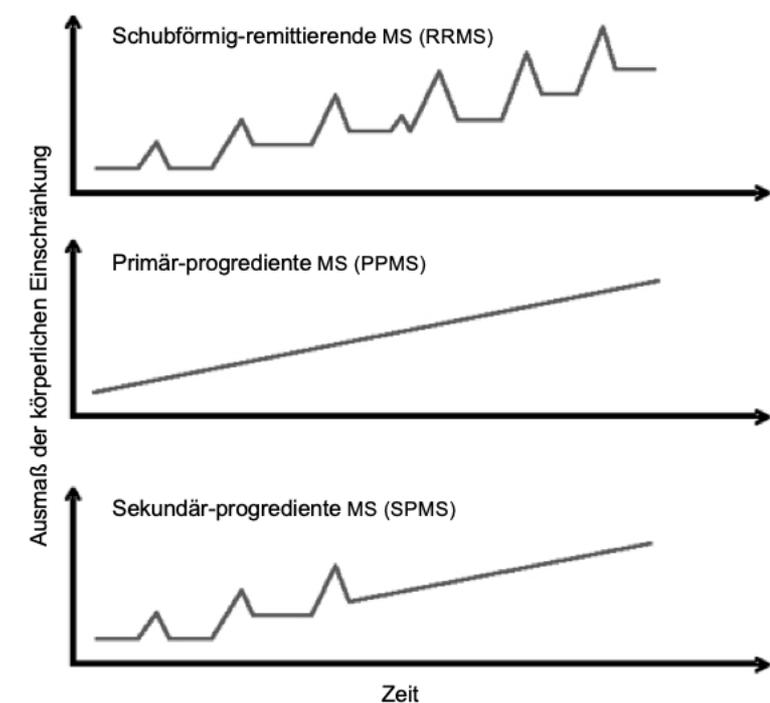


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

kontinuierliche Progredienz der Erkrankung ohne Rückbildung der klinischen Symptomatik (Dobson & Giovannoni, 2019; Kipp & Baumgartner, 2011).

Ursächlich für die Entstehung der MS scheint eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen zu sein. So konnten Studien zeigen, dass in 25 - 30 % beide eineiige und in 3 - 5 % beide zweieiige Zwillinge an MS erkrankten (Sadovnick, Ebers, Dyment, & Risch,

1996). Auf genetischer Ebene ist die Assoziation von HLA-DRB1*15:01 und einem erhöhten Risiko für MS bekannt, zudem wurden weitere immungenetische Marker wie IL2RA und IL7RA identifiziert, deren Vorkommen das Risiko an MS zu erkranken erhöhen (Leray, Moreau, Fromont, & Edan, 2016).

Da die MS-Inzidenz mit zunehmender Entfernung vom Äquator steigt, wird vermutet, dass eine erniedrigte Sonnenexposition und ein resultierender Vitamin D-Mangel zur Pathogenese der Erkrankung beitragen. So wurde in Beobachtungen gezeigt, dass Vitamin D einen immunmodulatorischen Effekt auf autoimmune Erkrankungen wie MS hat. Zudem konnte in einer weiteren Studie belegt werden, dass eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D das Risiko an MS zu erkranken verringert (Ascherio & Munger, 2016; Hayes et al., 2015; Pierrot-Deseilligny & Souberbielle, 2017).

Neben weiteren Umweltfaktoren wie Rauchen und Adipositas im frühen Lebensalter stehen humane Herpes Viren (HHV) im Verdacht, das Risiko an MS zu erkranken, zu erhöhen. So besteht ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung von MS nach einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (Ascherio & Munger, 2007; Olsson, Barcellos, & Alfredsson, 2017). Experimentelle Tiermodelle helfen, den Pathomechanismus der MS zu analysieren. Bedingt durch die Komplexität der Erkrankung wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, die wichtige Teilaspekte der MS darstellen. Ein oft verwendetes Modell ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), welches Rückschlüsse auf autoimmunvermittelte, inflammatorische Prozesse zulässt. Um den neurodegenerativen Aspekt der MS zu verstehen, eignet sich das toxische Cuprizone-Modell (Kipp, Clarner, Dang, Copray, & Beyer, 2009; Kipp, Nyamoya, Hochstrasser, & Amor, 2017; Lassmann & Bradl, 2017; Scheld et al., 2016).

1.2 Das Cuprizone-Modell

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches Tiermodell, welches die Untersuchung von De- und Remyelinisierungsprozessen unter Ausschluss autoimmunvermittelter, inflammatorischer Prozesse zulässt.

Gustav Nilson entdeckte 1950 den Kupferchelators Cuprizon (Bis(cyclohexanon)oxalhydrazon) (Nilsson, 1950).

Die Effekte von Cuprizone in Tiermodellen wurden erstmalig von William W. Carlton untersucht, der bereits die Neurotoxizität des Kupferchelators beobachtete.

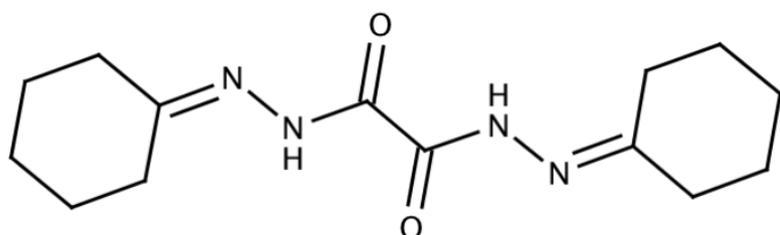


Abbildung 2: Strukturformel von Bis(cyclohexanon)oxalhydrazon (Cuprizone)

Die Versuchstiere entwickelten nach Cuprizone-Intoxikation Ödeme und es kam zu einer Mikrogliaaktivierung (Carlton, 1966, 1967, 1969).

William Blakemore entwickelte ein Jahrzehnt später das Cuprizone-Maus-Modell und führte Studien zu De- und Remyelinisierungsprozessen durch (Blakemore, 1972, 1973).

Untersuchungen an verschiedenen Mäusestämmen und anderen Tierspezies zeigten unterschiedliche Grade der Demyelinisierung nach Cuprizone Induktion (Adamo et al., 2006; Basoglu, Boylu, & Kose, 2013; Elsworth & Howell, 1973; Kanno, Sasaki, Yamada, Kawasako, & Tsuchitani, 2012; Ludwin, 1978; Skripuletz, Gudi, Hackstette, & Stangel, 2011). So reagierten Mäuse des Stammes BALB/cJ mit einer verzögerten und unvollständigen Demyelinisierung in bestimmten Hirnregionen im Vergleich mit dem Mäusestamm C57BL/6 (Skripuletz et al., 2008).

Auch das Geschlecht der Mäuse stellte eine relevante Einflussgröße auf den Effekt von Cuprizone dar. Beispielsweise zeigten weibliche Mäuse des Stammes SJL fast keine Demyelinisierung im Vergleich zu männlichen Mäusen (Taylor, Gilmore, & Matsushima, 2009). Weitere Beobachtungen konnten belegen, dass die Gabe von Östrogenen und Progesteronen vor einer durch Cuprizone induzierten Demyelinisierung schützt (Acs et al., 2009).

Weitere wichtige Einflussfaktoren waren das Gewicht und Alter der Tiere sowie die Dauer und Dosierung der Cuprizone-Intoxikation (Gudi, Gingele, Skripuletz, & Stangel, 2014).

Die Fütterung von 8 - 10 Wochen alten Mäusen des Stammes C57BL/6 mit einer Beimischung von 0,2% Cuprizone zum Futter führte zu einer deutlichen und reproduzierbaren akuten Demyelinisierung (Hiremath et al., 1998), welche sich ab der dritten Woche feststellen ließ und ihr Maximum nach 5 Wochen erreichte (Hibbits, Pannu, Wu, & Armstrong, 2009; Skripuletz et al., 2008). Eine spontane Remyelinisierung konnte nach Absetzen der Cuprizone Beimischung zum Normalfutter beobachtet werden (Kipp et al., 2009; Steelman, Thompson, & Li, 2012). Begleitend zeigte sich 4 bis 6 Wochen nach Ende der Cuprizone-Intoxikation ein Anstieg des Durchmessers der Myelinscheide und eine vermehrte Expression von Myelinproteinen (Lindner et al., 2008).

Eine chronische Demyelinisierung konnte nach 12-wöchiger Cuprizone-Intoxikation beobachtet werden, nach 14 Wochen traten systemische Symptome auf und nach 16 Wochen starben die Versuchstiere. Eine Remyelinisierung fand in diesem Zusammenhang kaum noch statt (Hibbits et al., 2009; Kipp et al., 2009; Matsushima & Morell, 2001; Skripuletz et al., 2010; Skripuletz et al., 2008).

Frühere Beobachtungen fokussierten sich vor allem auf die Demyelinisierung des *medialen Corpus callosum* und des *Pendunculus cerebellaris superior* (Blakemore, 1973; Torkildsen, Brunborg, Myhr, & Bø, 2008). Mittlerweile ist bekannt, dass sich die Läsionen auch in den *Basalganglien*, im *Cerebellum*, im *Kortex* und im *Hippocampus* ausbilden (Groebe et al., 2009; Kipp & Baumgartner, 2011; Koutsoudaki et al., 2009; Norkute et al., 2009; Pott et al., 2009).

Eine Cuprizone-Intoxikation führt abhängig von ihrer Dauer und Dosierung zu einer Demyelinisierung mit Mikrogliaaktivierung, Oligodendrozytenapoptose und Astrogliose bei intakter Blut-Hirn-Schranke (Bakker & Ludwin, 1987; Hiremath et al., 1998).

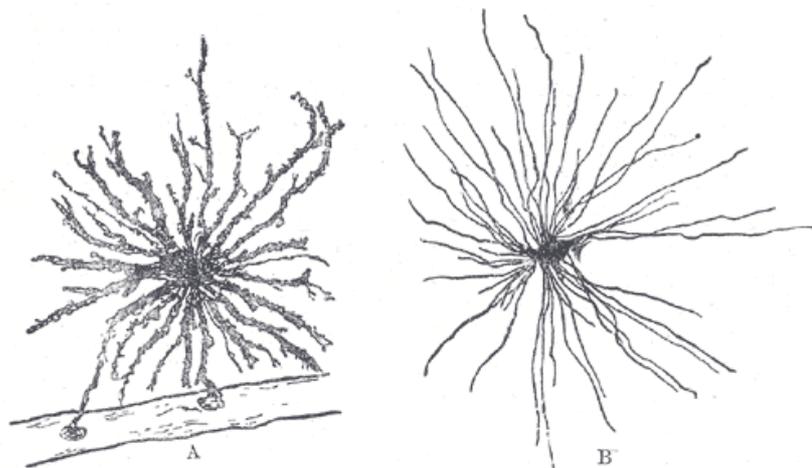
Die genaue Wirkung von Cuprizone auf den Organismus wurde bislang nicht vollständig aufgedeckt. Bereits kurz nach der Entdeckung des Kupferchelators konnten Riesenmitochondrien in Leberzellen (Suzuki, 1969) und Oligodendrozyten (Blakemore, 1972) nachgewiesen werden. Die morphologische Veränderung der Mitochondrien stärkt die Hypothese, dass Cuprizone die Zellatmung stört, indem es Einfluss auf die Kupfer enthaltene Metalloproteasen nimmt. Beobachtungen zeigten, dass eine Cuprizone-Intoxikation zu oxidativem Stress in Oligodendrozyten führt (Praet, Guglielmetti, Berneman, Van der Linden, & Ponsaerts, 2014). Der aus der Hemmung der Atmungskette resultierende Energiemangel führt zur Oligodendrozytenapoptose und zu einer Demyelinisierung (Kipp et al., 2009; Matsushima & Morell, 2001; Venturini, 1973).

1.3 Astrozyten

Astrozyten gehören mit ca. 30% zur größten Gruppe der Makroglia des ZNS. Morphologisch unterscheidet man zwei Subpopulationen: Protoplasmatische und fibrilläre Astrozyten.

Protoplasmatische

Astrozyten finden sich überwiegend in der grauen Substanz. Sie zeichnen sich durch kurze Fortsätze mit vielen feinen Verzweigungen aus. In der weißen Substanz kommen fibrilläre Astrozyten vor, welche durch das Vorkommen langer fibrillärer Zellfortsätze



gekennzeichnet sind (de Gruyter, 1986).

Jeder Astrozyt besitzt sein eigenes Territorium, welches durch seine

Abbildung 3: Protoplasmatischer und fibrillärer Astrozyt (Vandyke Carter & Gray, 1918)

(A) zeigt einen protoplasmatischen Astrozyten. Er kommt in der grauen Substanz vor und zeigt kurze, stark verzweigte Zellfortsätze. (B) zeigt einen fibrillären Astrozyten. Charakteristisch sind lange, fibrilläre Zellfortsätze und das Vorkommen in der weißen Substanz.

Fortsätze markiert wird (Sofroniew & Vinters, 2010; von Bartheld, Bahney, & Herculano-Houzel, 2016).

Astrozyten erfüllen vielfältige Funktionen. Bereits während der Entwicklung des Gehirns bilden sie Leitstrukturen für Neuroblasten (Powell & Geller, 1999) und senden molekulare Signale

aus, welche die Synapsenbildung fördern (Ullian, Sapperstein, Christopherson, & Barres, 2001). Astrozyten bilden mit ihren distalen Endfortsätzen die *Glia limitans* und stabilisieren so die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und der Meningen (Sofroniew, 2015; Sofroniew & Vinters, 2010). Viele Stoffwechselfunktionen des ZNS, wie die Regulation des Glutamat- Kalium- und Wasser-Haushaltes, werden durch Astrozyten aufrecht erhalten (Ransohoff & Brown, 2012). Benachbarte Astrozyten sind funktionell miteinander und mit Oligodendrozyten über *Gap junctions* verbunden und bilden große Glianetzwerke (Orthmann-Murphy, Abrams, & Scherer, 2008). Weitere Funktionen bestehen in der Regulation der neuronal synaptischen Übertragung (Santello & Volterra, 2010; Ventura & Harris, 1999) und in der Ausbildung einer antiinflammatorischen Umgebung durch Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine (Cannella & Raine, 1995; John, Lee, & Brosnan, 2003) und Expression des Fas-Liganden, der durch Bindung an den Fas-Rezeptor den Zelltod auslösen kann (Gimsa et al., 2004).

Historisch wurden Astrozyten als eine homogene Zellpopulation betrachtet. Diese Sichtweise wurde durch zahlreiche Studien widerlegt. Astrozyten zeigen eine große Heterogenität hinsichtlich ihrer Entwicklung, ihrer Morphologie und ihrer Genexpression (Bayraktar, Fuentealba, Alvarez-Buylla, & Rowitch, 2014; Chaboub & Deneen, 2012). Zudem unterscheiden sie sich in ihren physiologischen Eigenschaften und ihrer Reaktion auf pathologische Ereignisse (Farmer & Murai, 2017; Haim & Rowitch, 2017).

Im Rahmen der MS reagieren Astrozyten mit Proliferation, Hypertrophie und Ausbildung einer Glianarbe, ein Prozess, der als Astrogliose bezeichnet wird (Brosnan & Raine, 2013). Beobachtungen der letzten Jahre zeigten, dass die Rolle der Astrozyten in der Pathogenese der MS weit komplexer ist, als bislang angenommen. Astrozyten fördern die Demyelinisierung und provozieren Schäden an Oligodendrozyten und Axonen. Auf der anderen Seite begünstigen sie die Remyelinisierung und die Migration, Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen und erfüllen somit eine protektive Funktion (Farina, Aloisi, & Meinl, 2007; Kipp, Clarner, et al., 2011; Ponath et al., 2017; Sofroniew, 2015).

Um die Rolle der Astrozyten in der MS-Pathogenese besser verstehen zu können, ist eine adäquate Markierung dieser heterogenen Zellpopulation notwendig. Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist bis heute der am häufigsten verwendete Astrozytenmarker. Da sich die Markierung der Astrozyten mittels GFAP in mehreren Beobachtungen als unvollständig herausstellte, ist die Identifizierung weiterer Marker unabdingbar (Bushong, Martone, Jones, & Ellisman, 2002; Walz & Lang, 1998).

1.4 Astrozytenmarker

1.4.1 GFAP

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist ein 49,9 kDA schweres Protein, welches zu den Typ III Intermediärfilamenten gehört und erstmals 1969 in Plaques von MS-Patienten nachgewiesen wurde (Deka, Sarmah, Sharma, & Biswas, 2015) (Eng, Vanderhaeghen, Bignami, & Gerstl, 1971).

Neben Astrozyten (Eng et al., 1971) exprimieren viele weitere Zellen GFAP. So konnte das Vorkommen von GFAP in enterischen Gliazellen (Kato et al., 1990) und in Schwann-Zellen (Bianchini et al., 1992; Hainfellner et al., 2001) nachgewiesen werden, die zur Gruppe der peripheren Gliazellen gehören. Weitere Beobachtungen zeigten eine GFAP-Expression in Lymphozyten (Riol, Tardy, Rolland, Lévesque, & Murthy, 1997), myoepithelialen Zellen (Hainfellner et al., 2001; Viale et al., 1991), Lebersternzellen (Carotti et al., 2008), Chondrozyten (Hainfellner et al., 2001; Kepes, Rubinstein, & Chiang, 1984) und Fibroblasten (Hainfellner et al., 2001).

Das humane GFAP Gen findet sich auf Chromosom 17q21 und besteht aus neun Exons (Bongcam-Rudloff et al., 1991). Die am häufigsten vorkommende Variante des humanen GFAP-Proteins wird als GFAP α bezeichnet und durch die konstanten Exons 1 - 9 des GFAP-Gens codiert. Seit der Entdeckung der mRNA von GFAP α wurden neun weitere Varianten beschrieben (siehe Abbildung 4), die durch alternatives Spleißen entstehen (Blechingberg et al., 2007; Hol et al., 2003; Nielsen et al., 2002; Roelofs et al., 2005; Zelenika, Grima, Brenner, & Pessac, 1995).

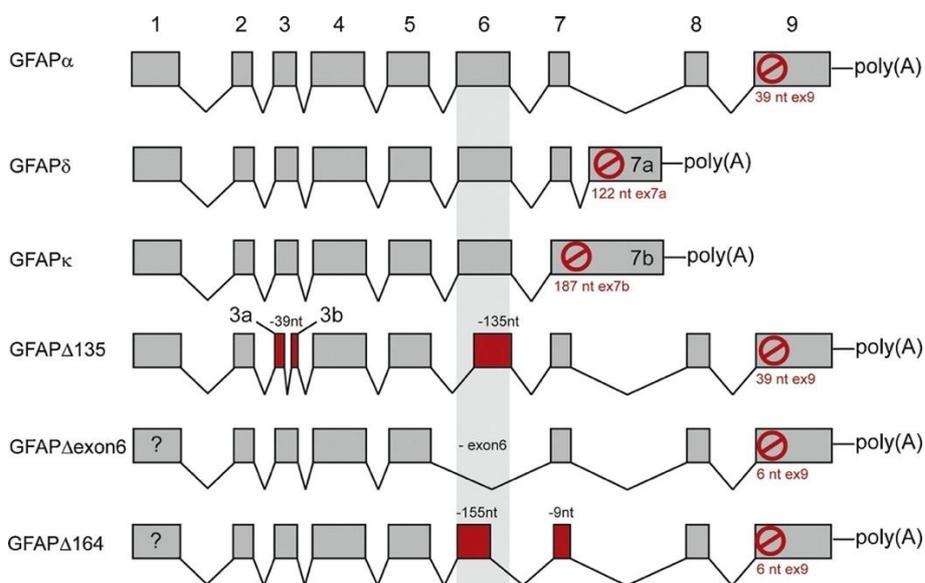


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung eines humanen GFAP-Gens mit möglichen Isotyp-Varianten (Middeldorp & Hol, 2011)

Wie in Abbildung 5 dargestellt, bestehen die GFAP-Varianten aus drei Hauptdomänen: Einer aminoterminalen "Kopf-", einer zentrohelikalen "Stab-" und einer carboxyterminalen "Schwanz"-Domäne.

Im Gegensatz zu den "Stab"-Domänen, welche sich beim Vergleich der verschiedenen GFAP-Varianten in ihrem Aufbau identisch zeigen, unterliegen die Aminosäuresequenzen der "Kopf"- und "Schwanz"-Domänen einer größeren

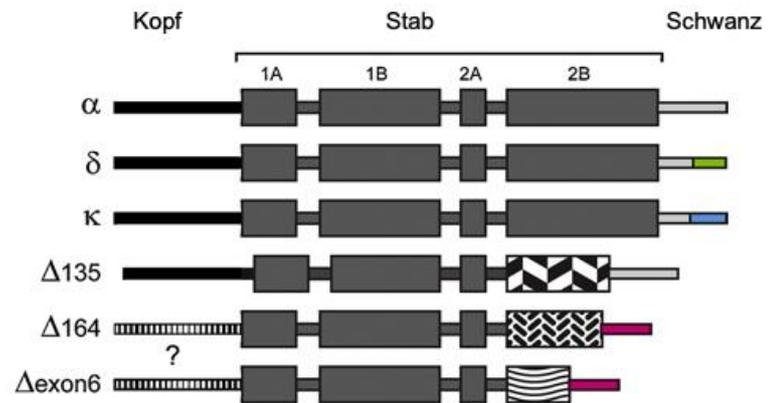


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines humanen GFAP-Proteins mit möglichen Isotyp-Varianten (Middeldorp & Hol, 2011)

Varianz (Reeves, Helman, Allison, & Israel, 1989; Weber & Geisler, 1985).

Es wird vermutet, dass die Hauptfunktionen von GFAP in Astrozyten die Stabilisierung der Zelle und deren Fortsätze, die Erhaltung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke sowie die Koordination der Zellmigration sind (Liedtke et al., 1996). Jüngste Beobachtungen zeigten, dass GFAP zusätzlich an der Zellproliferation (Rutka & Smith, 1993; Toda, Miura, Asou, Toya, & Uyemura, 1994) und an den Prozessen der zellulären Kommunikation beteiligt ist (Elobeid, Bongcam-Rudloff, Westermarck, & Nistér, 2000; Weinstein, Shelanski, & Liem, 1991).

GFAP spielt auch bei pathologischen Ereignissen eine wichtige Rolle. Der Anstieg oder Abfall der GFAP-Expression spiegelt Veränderungen der Astrozytenaktivität wider, die mit Schädigungen des Nervengewebes, Stoffwechselanomalien und neurodegenerativer Erkrankungen einhergehen (Eng, Ghirnikar, & Lee, 2000). Mutationen im GFAP-Gen und Autoantikörper gegen GFAP führen zu schweren neurologischen Erkrankungen wie der Alexander-Krankheit (Brenner et al., 2001) und der autoimmunen GFAP Astrozytopathie (Kimura, Takekoshi, Yoshikura, Hayashi, & Shimohata, 2019).

GFAP trägt in reifen Astrozyten zur Ausbildung einer Glianarbe als Reaktion auf ein pathologisches Ereignis bei (Pekny et al., 1999), zudem konnte eine Hochregulierung der GFAP-Expression beobachtet werden (Zhu et al., 2004).

Diese Eigenschaften machen GFAP zu einem häufig verwendeten Marker für die Visualisierung von Astrozyten unter physiologischen und pathologischen Prozessen.

Jüngste Beobachtungen legen jedoch nahe, dass der immunhistochemische Nachweis von Astrozyten mittels GFAP nicht die gesamte Astrozytenpopulation erfasst und es sich nicht bei allen GFAP⁺ Zellen um Astrozyten handelt. So konnten in einer Studie mittels GFAP-Immunhistochemie nur 15 % aller Astrozyten markiert werden (Bushong et al., 2002). Passend

zu diesen Erkenntnissen zeigten Beobachtungen eine Diskrepanz zwischen der Synthese von GFAP-mRNA und ihrer Transkription (Nolte et al., 2001). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass GFAP kein verlässlicher Marker für den Nachweis von Astrozyten ist.

1.4.2 ADLH1L1

Aldehyd-Dehydrogenase 1 family member L1 (ALDH1L1), auch Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase (FTHFD) genannt, ist ein zytosolisches Protein, das die Reaktion von 10-Formyltetrahydrofolat (10-FTHF) in Tetrahydrofolat (THF) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) katalysiert (Kutzbach & Stokstad, 1971).

Während der Embryogenese wird ALDH1L1 im ZNS von radialen Gliazellen exprimiert (Y. Yang et al., 2011). Im reifen ZNS konnte eine ALDH1L1-Expression vor allem in Astrozyten beobachtet werden. Ventrikuläre Ependymzellen und Neuronen exprimierten nur im geringen Maße ADLH1L1, keine Expression fand in Mikroglia und Oligodendrozyten statt (Neymeyer, Tephly, & Miller, 1997). Die ADLH1L1-Expression in Astrozyten wies zudem eine negative Korrelation mit dem Alter auf (Anthony & Heintz, 2007).

Das zu der Familie der Aldehyd-Dehydrogenasen gehörende Protein wurde erstmals 1968 beschrieben (Kutzbach & Stokstad, 1968), 1991 konnten cDNA-Klone aus der Ratte isoliert werden (Cook, Lloyd, & Wagner, 1991).

Das Gen für das humane ALDH1L1 Protein liegt auf Chromosom 3q21 und besitzt 27 Exons, bislang konnten drei Protein-Isoformen nachgewiesen werden (NCBI, 2020a).

ALDH1L1 ist an der de-novo-Nukleid-Biosynthese und an der Regeneration von Methionin beteiligt und hat somit einen Einfluss auf die Zellteilung und das Zellwachstum (Krupenko, 2009).

Eine Überexpression von ALDH1L1 führte in Zellkulturstudien zur Hemmung der Proliferation bestimmter Zelltypen (Oleinik & Krupenko, 2003). Zudem konnte eine stark verminderte ALDH1L1-Expression in einigen Tumorgeweben nachgewiesen werden (Krupenko & Oleinik, 2002).

2008 wurde ALDH1L1 erstmalig als Astrozytenmarker verwendet. Immunhistochemische Färbungen mit ADLH1L1 zeigten den Zellkörper einschließlich seiner stark verzweigten Fortsätze. (Cahoy et al., 2008).

Wenige Studien haben sich bislang mit der Expression von ALDH1L1 in reaktiven Astrozyten beschäftigt. Es liegt die Vermutung nahe, dass es zu einem Anstieg der ALDH1L1-Expression in reaktiven Astrozyten im Rahmen akuter Gehirnverletzungen sowie bei chronisch neurodegenerativen Zuständen kommt (Y. Yang et al., 2011).

1.4.3 Vimentin

Vimentin gehört als Klasse III Intermediärfilament zu einer Gruppe von Proteinen, die an der Ausbildung des Zytoskeletts von Zellen mesenchymalen Ursprungs beteiligt sind (Herrmann & Aebi, 2000).

Das Protein wurde erstmals 1978 in Mäusezellen mittels Fluoreszenzmikroskopie beschrieben (Franke, Schmid, Osborn, & Weber, 1978). Die vollständige cDNA von Vimentin wurde 1983 im Hamster isoliert (Quax-Jeuken, Quax, & Bloemendal, 1983). Die Sequenzierung des humanen Gens, welches sich auf Chromosom 10p13 befindet und zehn Exons enthält, erfolgte 1988 (Perreau, Lilienbaum, Vasseur, & Paulin, 1988).

Wie in Abbildung 6 gezeigt, besteht das 57 kDA schwere Protein aus einer zentralen Alpha-Spirale, welche von einer N- und C-terminalen Domäne flankiert wird (Goldie et al., 2007).

Die Alpha-Spirale besteht aus vier Fragmenten 1A, 1B, 2A und 2B, die mit L1-, L12- und L2-Regionen verknüpft sind (Herrmann, Bär, Kreplak, Strelkov, & Aebi, 2007).

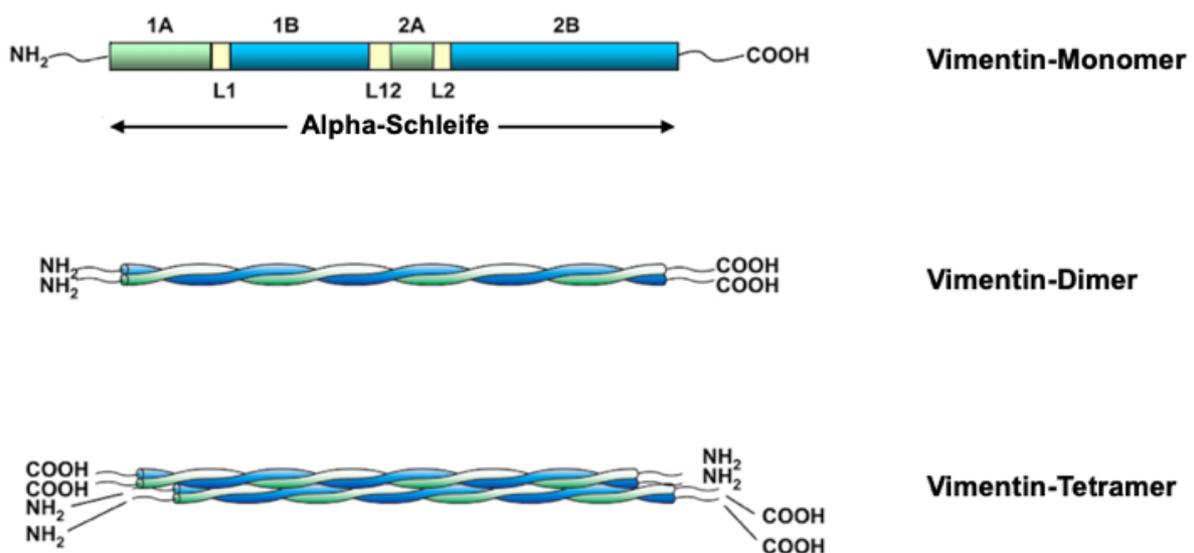


Abbildung 6: Struktur des Vimentin-Proteins (Tang, 2008)

Es ist anzunehmen, dass zwei Vimentin-Monomere kotranslational exprimiert werden, sodass die Bildung eines Dimers erleichtert wird (Chang, Shav-Tal, Trcek, Singer, & Goldman, 2006). Zwei Vimentin-Dimere lagern sich schließlich zu einem Vimentin-Tetramer zusammen und stellen die finale funktionelle Einheit des Proteins dar (Dave & Bayless, 2014; Helfand, Mikami, Vallee, & Goldman, 2002).

Untersuchung an Vimentin Knockout Mäusen (Vim $-/-$) konnten Hinweise über die vielfältigen Funktionen des Zytoskelettproteins aufzeigen. Vimentin scheint eine wichtige Rolle in Prozessen wie Zelldifferenzierung und -proliferation (Boraas & Ahsan, 2016; Cheng et al., 2016) -adhesion (Nieminen et al., 2006), -migration (Eckes et al., 2000; Eckes et al., 1998)

und -invasion (Richardson et al., 2018) zu spielen. Zahlreiche physiologische Prozesse wie die Entwicklung von Gliazellen (Colucci-Guyon, Giménez, Maurice, Babinet, & Privat, 1999), die Myelinisierung peripherer Nerven (Triolo et al., 2012), die Angiogenese (Antfolk et al., 2017) und Steroidgenese (Shen et al., 2012) zeigten sich in Vim -/- Mäusen hingegen beeinträchtigt.

Es wird angenommen, dass Vimentin in der Pathogenese vieler Erkrankungen wie Neoplasien (Chu, Seftor, Romer, & Hendrix, 1996; Kidd, Shumaker, & Ridge, 2014; Kokkinos et al., 2007; Zhang et al., 2009), Katarakt (Müller et al., 2009), Morbus Crohn (Scharl et al., 2015), Rheumatoide Arthritis (Nicaise Roland et al., 2008) und Erkrankungen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (Fernández-Ortega et al., 2016) eine bedeutende Rolle zukommt. Vimentin hat sich zudem als Marker für Astrozyten im Rahmen von ZNS-Schädigungen und Erkrankungen etabliert. Beobachtungen konnten zeigen, dass es nach einer Schädigung der Gehirns durch Schlaganfall oder Trauma zu einer Erhöhung der Vimentin-Expression in aktivierten Astrozyten kommt (Liu et al., 2014). In einer weiteren Studie konnten in MS-Läsionen zahlreiche intensiv Vimentin⁺ Astrozyten vom protoplasmatischen und fibrillären Typ nachgewiesen werden (Yamada, Kawamata, Walker, & McGeer, 1992). Damit einhergehend fand sich eine erhöhte Vimentin Expression in reaktiven Astrozyten in post-mortem Gewebeschnitten von MS-Patienten (Holley, Gveric, Newcombe, Cuzner, & Gutowski, 2003).

1.4.4 BLBP

Das Brain lipid-binding protein (BLBP), auch als fatty acid-binding protein 7 (FABP7) bezeichnet, gehört zu der Gruppe der zytoplasmatischen fatty acid-binding proteins (FABPs), die die Aufnahme, den Transport und den Metabolismus von Fettsäuren regulieren (Nielsen et al., 2002). Zudem wird angenommen, dass BLBP durch die Modulation der Aufnahme und der intrazellulären Verteilung von Fettsäuren einen Einfluss auf Signaltransduktion und genregulatorische Aktivitäten haben könnte (Kipp, Clarner, et al., 2011; Owada, Yoshimoto, & Kondo, 1996).

BLBP wird hauptsächlich in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Sharifi et al., 2013) und Astrozyten (Owada et al., 1996) exprimiert.

Bis heute sind zehn verschiedene FABPs bekannt, von denen FABP3, FABP5 und FABP7 im ZNS vorkommen (Owada et al., 1996).

Das BLBP-Protein konnte erstmals 1994 in Neuroepithelzellen der Maus nachgewiesen werden (Kurtz et al., 1994).

Das humane BLBP-Gen befindet sich auf Chromosom 6q22 und besteht aus vier Exons (Godbout, Poon, & Liu, 2014). Bislang konnten vier verschiedenen Isoformen für das 14 - 15 kDA schwere Protein belegt werden (NCBI, 2020b).

Wie in Abbildung 7 dargestellt, besteht das Protein aus zehn antiparallelen Beta-Faltblättern, die von zwei Alpha-Helices überlagert werden (Godbout et al., 2014).

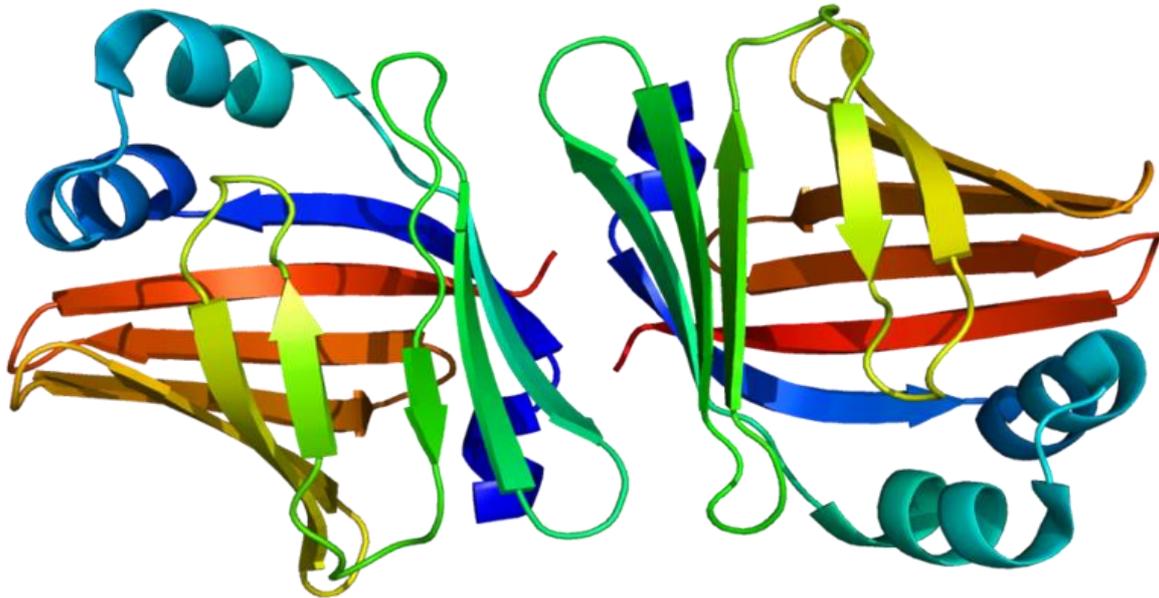


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des BLBP-Proteins (Ernst, 2009)

BLBP scheint in verschiedenen Pathomechanismen des ZNS eine aktive Rolle zu spielen. Es wird angenommen, dass BLBP an der Regulation von ZNS Schäden beteiligt ist (Belayev et al., 2011; Sharifi et al., 2011) und Einfluss auf den Progress und die Zellmorphologie des malignem Glioms ausübt (Kagawa et al., 2019; Mita et al., 2007).

Mehrere Studien an verschiedenen MS-Tiermodellen lieferten zudem Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Astrozyten und einer erhöhten BLBP-Expression (Bannerman, Hahn, Soulika, Gallo, & Pleasure, 2007; Kipp, Clarner, et al., 2011; Kipp, Gingele, et al., 2011).

1.4.5 S100 β

Das 21 kDA schwere, calciumbindende Protein S100 β gehört zu der aus mindestens 21 Mitgliedern bestehenden Familie der S100-Proteine (Marenholz, Heizmann, & Fritz, 2004). S100 β kommt im Nervensystem, vor allem in Astrozyten und anderen Gliazellen, wie Ependymzellen, enterischen Gliazellen, Oligodendrozyten, retinalen Müllerzellen und Schwannzellen sowie in bestimmten Neuronensubpopulationen vor (Didier et al., 1986; Ferri et al., 1982; Ludwin, Kosek, & Eng, 1976; Rickmann & Wolff, 1995; Q. Yang et al., 1995). Mehrere Studien beobachteten zudem das Vorkommen von S100 β außerhalb des Nervengewebes in Adipozyten, Chondrozyten und Myoblasten (Cocchia, Michetti, & Donato,

1981; Michetti, Dell'Anna, Tiberio, & Cocchia, 1983; Stefansson, Wollmann, Moore, & Arnason, 1982; Tubaro, Arcuri, Giambanco, & Donato, 2010).

Das S100 β Protein wurde 1977 erstmals aus bovinen Gehirnzellen isoliert (Isobe, Nakajima, & Okuyama, 1977; Isobe, Tsugita, & Okuyama, 1978).

Das humane S100 β -Gen befindet sich auf Chromosom 21q22 und besteht aus drei Exons (Allore et al., 1988).

Die Proteine der S100-Familie folgen dem gleichen Grundaufbau. Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, ist das S100 β -Protein ein

Homodimer und besteht aus zwei Beta-Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Jede Beta-Untereinheit besteht selbst aus zwei EF-Hand-Strukturen (Helix-Loop-Helix), die durch eine Hinge-Region verbunden sind (Beaudeau, Dequen, & Foglietti, 1999; S. P. Smith, Barber, Dunn, & Shaw, 1996). S100 β besitzt vier Bindungsstellen für Calcium

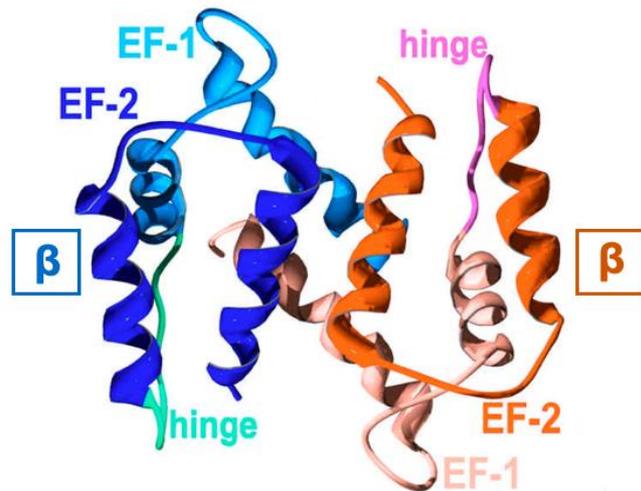


Abbildung 8: Struktur des S100-Proteins (Heizmann, Fritz, & Schäfer, 2002)

(Heizmann, 1999; Isobe et al., 1978). Die Bindungsaffinität für Calcium wird durch das Binden von Kupfer (Nishikawa et al., 1997) und Zink (Donato, 1991; Heizmann, 1999) an entsprechende Bindungsstellen reguliert (Heizmann & Cox, 1998).

Zahlreiche intrazelluläre Mechanismen wie die Zellproliferation und -differenzierung (Arcuri, Bianchi, Brozzi, & Donato, 2005; Baudier, Delphin, Grunwald, Khochbin, & Lawrence, 1992; Millward, Heizmann, Schäfer, & Hemmings, 1998), die Calcium-Homöostase (Gentil et al., 2001; Pozdnyakov et al., 1997), verschiedene Enzymaktivitäten (Brozzi, Arcuri, Giambanco, & Donato, 2009; Tsoporis, Overgaard, Izhar, & Parker, 2009; Zimmer & Van Eldik, 1986) und der Aufbau und Erhalt des Zytoskeletts (Baudier & Cole, 1988; Donato, 1988; Mbele et al., 2002) werden durch S100 β reguliert.

Auch im Zusammenhang mit pathologischen Mechanismen konnten Studien zeigen, dass S100 β eine bedeutende Funktion einnimmt.

S100 β wird als diagnostischer Marker für akute Hirnverletzungen (Chong, 2016; de Azúa López et al., 2015; Thelin et al., 2017) und für das Maligne Melanom verwendet (Brouard et al., 2000; Loppin et al., 2007).

Im Kontext der MS konnten erhöhte extrazelluläre S100 β -Konzentration im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen werden (Michetti, Massaro, & Murazio, 1979), in späteren

Beobachtungen zeigte sich eine Korrelation mit der Schwere der Erkrankung (Michetti et al., 2012).

Erst seit kurzem beschäftigen sich Studien mit der Fragestellung, inwieweit S100 β ein geeigneter Astrozytenmarker darstellt (Wang & Bordey, 2008).

Beobachtungen zeigten, dass S100 β neben Astrozyten auch von Zellen der Oligodendrozytenzelllinie exprimiert wird, sodass die abschließende Klärung der Rolle von S100 β als Marker für Astrozyten noch aussteht (Deloulme et al., 2004; Hachem et al., 2005).

1.5 Fragestellung

Im Rahmen der MS reagieren Astrozyten mit Proliferation, Hypertrophie und Ausbildung einer Glianarbe (Faulkner et al., 2004; Pekny & Nilsson, 2005). Dieser als Astrogliose bezeichnete Prozess ist hinsichtlich seiner Auswirkung auf den Pathomechanismus der MS noch nicht ausreichend geklärt. Viele Studien konnten die ausgeprägte Heterogenität der Astrozyten hinsichtlich ihrer Entwicklung, Morphologie, Genexpression und Reaktion auf pathologische Ereignisse zeigen (Bayraktar et al., 2014; Chaboub & Deneen, 2012; Farmer & Murai, 2017; Haim & Rowitch, 2017). Aus diesem Grund ist die Auswahl geeigneter Marker für die Analyse dieser heterogenen Zellpopulation unabdingbar. Immunhistochemische Untersuchungen lassen vermuten, dass der Nachweis mittels GFAP nicht die gesamte Astrozytenpopulation erfasst (Bushong et al., 2002). Somit stellt sich die Frage nach weiteren geeigneten Astrozytenmarkern.

In der vorgelegten Dissertationsarbeit untersuchte ich die Expression von GFAP, ADLH1L1, Vimentin, BLBP und S100 β in Astrozyten unterschiedlicher Hirnregionen im Cuprizone-Modell. Ziel meiner Arbeit war es Ähnlichkeiten und Unterschiede hinsichtlich Astrozytenzahlen und ihrer Morphologie während der Toxin-induzierten Demyelinisierung aufzudecken.

2. Materialien

Tabelle 1: Materialien - Tierstall

Material	Hersteller	Produktkennzeichnung	Beschreibung
Cuprizon	Sigma Aldrich Life Science	C9012-25G Lot#BCB26101V 101755746	Bis(cyclohexanone)-oxaldihydrazone
Einstreu	Abedd Vertriebs GmbH	H0234-40	Abedd Espe Classic; 2,5 mm 190 g/L [LtE E-001]
Futter	Ssniff Spezialdiäten GmbH	V1126-003	ssniff® M-Z Extrudat ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse
Käfig	Tecniplast Vertrieb GmbH	ACRE011	Käfigtyp: 1284 L, plus Haube und Trinkflasche) aus Polysulfon mit IVC Gitter und Häuschen aus Polycarbonat
Küchenmaschine	WMF Group GmbH	6.130.220.500	WMF Kult X Küchenmaschine
Nest	Zoonlab GmbH,	3097055	Nestlitz aus Baumwolle (5 x 5 cm)
Wiegeschale	VWR	611-9178	46 x 46 x 8 cm

Tabelle 2: Materialien - Perfusion

Material	Hersteller	Produktkennzeichnung	Beschreibung
Becherglas	VWR	213-1111	1000 ml
Bienenwachs	Carl Roth GmbH + Co. KG	5830.1	gelb, rein natürlich
Chloralhydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	K318.1	C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂ , ≥ 99,5 %, Ph.Eur., BP, USP, Trichloracetaldehydhydrat

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	1.065.801.000	Na ₂ HPO ₄
Einmalspritze 1 ml	B. Braun Melsungen AG,	9161406 V	Omnifix®-F Solo ohne Kanüle/Luer- Ansatz/zentrisch/1 ml
Einmalspritze 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland	4617207 V	Omnifix® Solo/Luer- Lock- Ansatz/zentrisch/ 20 ml
Einmalspritze 50 ml	Dispomed Witt oHG	22050	Infuject® Spritze für Infusionspumpen/ Luer-Lock-Ansatz/ 50 ml
Falconröhrchen	Carl Roth GmbH + Co. KG	N463.1	Rotilabo®- Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit Beschriftungsfeld
Filterpapier	Schleicher&Schuel l	594 1/2	Æ240 mm
Formaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG	CP10.2	Formaldehyd 37 %
Infusomat® Space Line	B. Braun Melsungen AG	8700036S P	Infusomat® Space Leitung Type IV- Standart/Luer-Lock- Ansatz/250 cm
Kanüle	B. Braun Melsungen AG	4656300	Sterican® Einmal- Injektions-Kanüle, 0.30 x 12 mm BL/LB, 30G
NaCl 0,9 %	B. Braun AG, Melsungen		Isotone Kochsalz- lösung 500 ml
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	1.063.461.000	NaH ₂ PO ₄
Natronlauge	Carl Roth GmbH + Co. KG	K021.1	NaOH 1 mol/L

OP-Besteck			Schere, Pinzette stumpf, Pinzette chirurgische, Stecknadeln
Original- Perfusor® Line	B. Braun Melsungen AG	8722960	Original-Perfusor®- Leitung Typ IV- Standard, 1,5 x 2,7 mm, 150 cm
Safety- Multifly® - Kanüle	Sarstedt	851637235	Safety- Multifly® - Kanüle für Kurzzeit- infusionen, 20G/200 mm lang
Schottflaschen	VWR	215-1557	Enghalsflasche mit Schraubverschluss, 1000 ml
Schottflaschen	VWR	215-1558	Enghalsflasche mit Schraubverschluss, 2000ml
Trichter	VWR	221-1730	Æ250 mm

Tabelle 3: Materialien - Paraffineinbettung

Material	Hersteller	Produktkennzeichnung	Beschreibung
Einbettungs- kassetten	Bio Optica	07-7300	MegaKassette
Ethanol	Merck	100.983	
Isopentan	VWR	78-78-4 24872229	(CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ - CH ₃ , 2-methylbutane, C ₅ -H ₁₂
Objektträger	VWR	631-1310	Menzel-Gläser Superfrost® Plus
Paraffin	Merck	K46815058603	
Paraplast	Leica Biosystems	39602012	
Sucrose	Merck Millipore	107.687	Sucrose (Saccharose) für biochem. Reag. Ph Eur. CAS 57-50-1,

			pH 7 (100 g/l, H ₂ O, 20 °C)
Tissue-Tek	VWR, Sakura Finetek	25608-930	Tissue-Tek* O.C.T. Compound
Trockeneis			
Xylol	VWR	30 28975.325	isomerisch. Analar normapur ACS, ISO

Tabelle 4: Materialien - Paraffinschneiden

Material	Hersteller	Produktkennzeichnung	Beschreibung
Mikrotomklingen	pfm medical	207500000	Feather S35
Objektträger Superfrost®	VWR	631-0912	

Tabelle 5: Materialien - Histologische Gewebsaufbereitung

Material	Hersteller	Produktkennzeichnung	Beschreibung
ABC Kit-Elite	Vector Laboratories	PK-6100	VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (Peroxidase, Standard)
Citrat	Merck	1.00244.	Zitronensäure – Monohydrat p.a., C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O
DAB Chromogen (Stock)	Dako	K3469	Diaminobenzidin
DAB Substrat Puffer	Dako	K3469	Imidazole-HCL Puffer pH 7,5
DAPI	Sigma Aldrich Life Science	14530	bisBenzimide H33258 C ₂₅ H ₂₄ N ₆ O · 3HCl
Deckgläschen	Menzel Gläser	BB024060A1	24 x 60 mm
DePeX	Serva	001824301	Eindeckmedium
EDTA	Sigma Aldrich Life Science	3685	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2 H ₂ O

Eppendorf Spitzen	VWR	022492012	0,1-20 µl
Eppendorf Spitzen	VWR	0030000870	2-200 µl
Eppendorf Spitzen	VWR	0030000919	50-1000 µl
Eppendorf Tubes	VWR	0030120.086	1,5 ml
Eppendorf Tubes	VWR	0030120.094	2,0 ml
Ethanol	Merck	1.00983.	C2H6O
FlourPreserve™ Reagent	EMD Millipore	345787-25ML	
Normal donkey serum	Sigma Aldrich Life Science	D9663	Normales Esel Serum
Normal goat serum	Vector Laboratories	S-1000	Normales Ziegen Serum
PBS	Merck	L-182-50	PBS-Pulver ohne Ca2+/Mg2+
Tris	Appli Chemie	A-1086	C4H11NO3
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG	8070.4	Wasserstoffperoxid H2O2, 30 %
Xyloxol	VWR	30 28975.325	Isomerisch, Analar normapur ACS, ISO

Tabelle 6: Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Produktkennzeichnung
Anti-ALDH1L1	Abcam	ab87117
Anti-BLBP	Abcam	ab32423
Anti-GFAP	Abcam	ab4674
Anti-Olig2	Merck Millipore	MABN50
Anti-S100β	Abcam	ab41548
Anti-Vimentin	Abcam	ab92547

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Produktkennzeichnung
Biotinylated goat anti-chicken	Vector Laboratories	BA-9010

Biotinylated goat anti-rabbit	Vector Laboratories	BA-1000
donkey anti-mouse Alexa Fluor® 594	Life Technologies/Invitrogen	A-21203
donkey anti-rabbit Alexa Fluor® 488	Life Technologies/Invitrogen	A-21206
goat anti-chicken Alexa Fluor® 594	Life Technologies/Invitrogen	A-11042
goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488	Life Technologies/Invitrogen	A-11008

Tabelle 8: Geräte

Gerät	Hersteller	Produktkennzeichnung
Inkubator 48 °C (trocknen)	Thermo Scientific Heraeus®	50045764
Flächenkamera	Basler	Basler ace acA1920-40uc 106910-09
Inkubator 26 °C	Thermo Scientific Heraeus®	50042293
Kofokal Mikroskop	Olympus Life Science	Olympus BX51WI
Magnetrührer	IKA Labortechnik	Magnetrührer Basic 2
Mikroskop	Nikon	Nikon Eclipse E200 243194/0
Mikrotom	Leica Biosystems	SM2000R
Mikrowelle	Exquisit	MW WP700j17B-2
pH-Meter	WTW	103642
Pipetten (3er-Set)	Eppendorf AG	3120000909
Schüttler (orange)	SunLab®	SU1020
Vortex	Bender&Hobein AG	G-560E
Wasserbad	Leica Biosystems	HI1210

3. Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6J (Janvier/Frankreich) verwendet. Die Tiere waren 10 Wochen alt und 19-21 g schwer. Die Tierhaltung erfolgte unter standardisierten Laborbedingungen gemäß der Organisation "Federation of European Laboratory Animal Science Association's (felasa)". Ein standardisierter Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden und eine konstante Raumtemperatur von $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ wurden gewährleistet. Die Luftfeuchtigkeit lag durchgehend bei $55\% \pm 10\%$ und die Käfige unterlagen einer regelmäßigen Luftzirkulation. Die Ausstattung jedes Käfigs bestand aus Einstreu, Mäusehaus, Nestlet, Futter und einer Trinkflasche.

Die aktuell geltenden Tierschutzbestimmungen wurden bei allen Versuchstieren eingehalten. Gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) lag eine Genehmigung für die Tierversuchsführung durch die Regierung von Oberbayern vor (Tierversuchsgenehmigung 55.2-1-54-2532-73-15).

3.2 Durchführung der Versuche und Materialgewinnung

Die Mäuse wurden 3 Wochen täglich mit 0,25 % Cuprizin intoxiciert. Pro Käfig wurden 0,5 g Cuprizin, homogenisiert in 200 g pulverisierten Standard-Futter, verabreicht. Die Mäuse der Kontrollgruppe erhielten Normalfutter. Die Käfige wurden jeden dritten Tag gewechselt.

Nach fünf Wochen wurde die transkardiale Perfusion der Tiere durchgeführt. Im ersten Schritt wurde durch die intraperitoneale Gabe eines Narkosemittels der Hirntod herbeigeführt. Nach dem Erlöschen der Hirnstammreflexe wurden die Tiere auf einer Wachsplatte fixiert und der Thorax eröffnet. Über den linken Ventrikel des Herzens wurden zuerst 20 ml PBS-Lösung gefolgt von zweimal 50 ml PFA-Lösung perfundiert. Nach abgeschlossener Perfusion erfolgte die sagittale Eröffnung der Schädelkalotte, um die Fixationslösung in den Schädel eindringen zu lassen. Die Präparate wurden jeweils 24 h bei 4°C in einem Falcon-Tube mit 50 ml PFA postfixiert.

Tabelle 9: Chemikalien für die transkardiale Perfusion

PBS (1X)-Lösung für 5 L	
Substanz	Menge
PBS-Pulver	477,5 g
Aqua destillata	5 L
4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für 1 L (pH=7,4)	
Substanz	Menge

Aqua destillata	900 ml
37 % Formaledehyd	100 ml
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	8 g
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	4,6 g

Nach abgeschlossener Postfixation wurden die Gehirne aus der Schädelkalotte gelöst und in Einbettkassetten gelegt. Die Gehirne wurden wie in Tabelle 10 beschrieben durch die aufsteigende Alkoholreihe eingebettet, um die Präparate aus dem wässrigen Milieu in Paraffin zu überführen.

Nach Beenden der beschriebenen Aufbereitungsschnitte wurden die Präparate so in neue Einbettungskassetten gelegt, dass die Ausrichtung der Präparate eine koronare Schnittfläche ergab. Anschließend wurden die Einbettungskassetten mit warmen, flüssigem Paraffin aufgefüllt und bis zum vollständigen Aushärten auf einer Kälteplatte gelagert. Die anschließende Aufbewahrung der Paraffinblöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

Tabelle 10: Paraffineinbettung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Leitungswasser, fließend	5 h
2	50 % Ethanol	über Nacht
3	70 % Ethanol	40 min
4	70 % Ethanol	40 min
5	96 % Ethanol	40 min
6	96 % Ethanol	40 min
7	96 % Ethanol	40 min
8	100 % Ethanol	40 min
9	100 % Ethanol	60 min
10	100 % Ethanol	60 min
11	Xylol	40 min
12	Xylol	40 min
13	Xylol	40 min
14	Paraffin	60 min
15	Paraffin	60 min
16	Paraffin	2 Tage

Aus den Paraffinblöcken wurden 5 µm dicke Schnittserien der Region 275 angefertigt. Die Identifizierung der Region wurde mithilfe des „Mouse Brain Atlas“ (Sidman et al., 1971) durchgeführt. Es wurden immer zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Die fertigen Objektträger wurden zuerst drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, um eine bessere Haftung der Gehirnschnitte am Objektträger zu gewährleisten. Danach wurden sie über Nacht im Wärmeschrank bei 48°C getrocknet. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte bis zu ihrer Verwendung in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur.

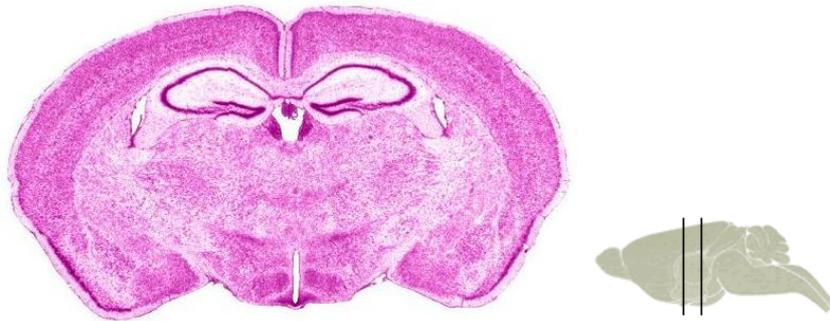
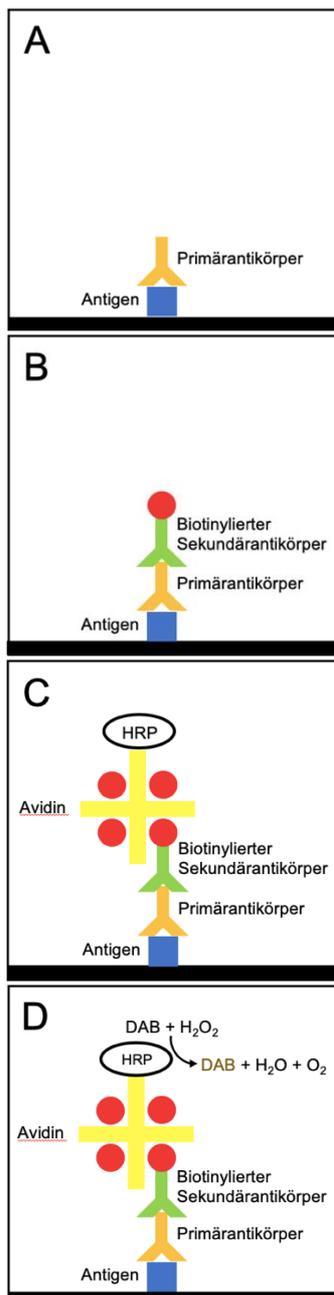


Abbildung 9: Region 275 in koronarer Ansicht (Sidman et al., 1971)

3.3 Immunhistochemische Färbung

3.3.1 Prinzip

Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen können Proteine im Gewebe detektiert und visualisiert werden. Ein sehr spezifisches Visualisierungsverfahren stellt die indirekte ABC-Methode dar, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, um die Proteine GFAP, ADLH1L1, Vimentin, BLBP und S100B darzustellen:



Der Primärantikörper bindet selektiv an das Epitop des gesuchten Proteins im Gewebe (Abbildung 10 **A**).

Der biotinylierte Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet. Er bindet im zweiten Schritt an den Primärantikörper (Abbildung 10 **B**).

Der Avidin-Biotin-HRP-Komplex bindet aufgrund der Affinität von Avidin zu Biotin an den biotinylierten Sekundärantikörper (Abbildung 10 **C**).

Die HRP katalysiert die Reaktion der Substrate DAB und H₂O₂. Ein Produkt dieser Reaktion ist ein braunes Präzipitat des DAB, welches den Ort des Antigens visualisiert (Abbildung 10 **D**).

Abbildung 10: Schematische Darstellung der ABC-Methode

3.3.2 Durchführung

Um standardisierte und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Färbung aller Schnitte nach dem gleichen Färbeprotokoll durchgeführt (siehe Tabelle 15).

Im ersten Schritt wurde das in Paraffin eingebettete Gewebe in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe in eine wässrige Lösung überführt (siehe Tabelle 15). Durch die Paraffineinbettung sind Proteine häufig durch Methylenbrücken verknüpft und somit maskiert. Für die Demaskierung wird das Gewebe in einer wässrigen Lösung mit Citrat oder Tris/EDTA gekocht, sodass sich die Methylenbrücken auflösen. In einem Vorversuch wurde für jeden verwendeten Primärantikörper das passende Demaskierungsverfahren und die Antikörperkonzentration ermittelt, eine Auflistung findet sich in Tabelle 12.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden freie Bindungsstellen im Gewebe mit Serum blockiert. Über Nacht wurde das Gewebe mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die endogene Peroxidase mit H_2O_2 blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper. Als dritte Komponente wurde ein Avidin/Biotin-HRP-Komplex hinzugefügt, welcher an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Die Visualisierung erfolgte über die Umsetzung des Substrates DAB durch die HRP in ein braunes Präzipitat. Zur besseren anatomischen Orientierung im Gewebe wurde eine Kernfärbung mit Mayers Hämalaun durchgeführt. Zum Schluss wurden die Gewebsschnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit DPX eingedeckt. Die Herstellung der verwendeten Lösungen und das Protokoll der immunhistochemischen Färbung sind in den Tabellen 11 - 15 zusammengefasst.

Tabelle 11: Lösungen der immunhistochemischen Färbung

Lösung	Herstellung
PBS (10X) Stocklösung	<ul style="list-style-type: none"> • 477,75 g PBS-Pulver in 5 L Aqua destillata auflösen • Mit HCl erfolgt die Einstellung auf pH=7,40
PBS (1X) Gebrauchslösung	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (10X) und Aqua destillata im Verhältnis von 1:10 lösen • Mit HCl erfolgt die Einstellung auf pH=7,40
5 % Normal Goat Serum (NGS)	<ul style="list-style-type: none"> • 2,5 ml NGS in 47,5 ml PBS (1X) lösen • Aliquotieren (1 ml) und bei -20 °C lagern
0,3 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	<ul style="list-style-type: none"> • 30 % H_2O_2 mit Aqua destillata im Verhältnis 1:10 vermengen • Herstellung unmittelbar vor Gebrauch und lichtgeschützte Lagerung
Citrat-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 10,5 g Citrat in 4,5 L Aqua destillata lösen. • Mit HCl erfolgt die Einstellung auf pH=6,0 • Mit Aqua destillata auf 5 L Gesamtvolumen auffüllen
Tris/EDTA-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 6,05 g Tris und 1,85 g EDTA in 5 L Aqua destillata lösen.

	<ul style="list-style-type: none"> • Mit NaOH erfolgt die Einstellung auf pH=9,0
DAB-Lösung (1:50)	<ul style="list-style-type: none"> • 28 µl DAB Stock in 1372 µl DAB Substrat lösen

Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung	Demaskierung	Lösung
ALDH1L1	Abcam	ab87117	1:2000	Keine	5 % NGS
BLBP	Abcam	ab32423	1:1000	Tris/EDTA	5 % NGS
GFAP	Abcam	ab4674	1:1000	Tris/EDTA	5 % NGS
S100β	Abcam	ab41548	1:10.000	Tris/EDTA	5 % NGS
Vimentin	Abcam	ab92547	1:200	Tris/EDTA	5 % NGS

Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung	Konjugat	Lösung
Anti-Chicken	Vector Laboratories	BA-9010	1:200	Biotin	5 % NGS
Anti-Rabbit	Vector Laboratories	BA-1000	1:200	Biotin	5 % NGS

Tabelle 14: Zuordnung von Primär- und Sekundärantikörpern

Primärantikörper	Hergestellt in	Passender Sekundärantikörper
ALDH1L1	Rabbit	Anti-Rabbit
BLBP	Rabbit	Anti-Rabbit
GFAP	Chicken	Anti-Chicken
S100β	Rabbit	Anti-Rabbit
Vimentin	Rabbit	Anti-Rabbit

Tabelle 15: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbung

Tag 1		
Arbeitsschritt	Durchführung	Zeit
Entparaffinierung	<ul style="list-style-type: none"> • Xylol I • Xylol II • Xylol III • Xylol 50%/Ethanol 50 % • Ethanol 100 % • Ethanol 100 % • Ethanol 96 % • Ethanol 96 % • Ethanol 70 % • Ethanol 70 % • Ethanol 50 % • Aqua destillata 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 min • 10 min • 10 min • 5 min • 3 min
Antigendemaskierung (fakultativ)	<ul style="list-style-type: none"> • OT in Plastikkuvette stellen und mit Tris/EDTA- oder Citrat-Puffer füllen. • In der Mikrowelle zum Kochen bringen • Bei reduzierter Leistung köcheln • Abkühlen im Wasserbad bei Raumtemperatur 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 min • 10 min • 20 min
Waschschritt	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min

	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min
Blockierung	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettieren von je 100 µl 5 % NGS pro OT • Inkubation in der feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 26 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • 60 min
Inkubation des Primärantikörpers	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettieren von je 100 µl Primärantikörperlösung pro OT • Inkubation in der feuchten Kammer im Kühlschrank bei 4 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • Über Nacht
Tag 2		
Waschschrift	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min • 5 min
Blockierung der endogenen Peroxidase	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubation der OT mit je 100 ml 0,3 % H₂O₂ in lichtgeschützter Glasküvette. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min
Waschschrift	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min • 5 min
Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettieren von je 100 µl Sekundärantikörperlösung pro OT • Inkubation in der feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 26 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • 60 min
Waschschrift	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min • 5 min
Avidin/Biotin-HRP-Komplex	<ul style="list-style-type: none"> • Enzymkonjugat aus A und B je 1:50 in PBS (1X) verdünnt herstellen und lichtgeschützt lagern • Pipettieren von je 100 µl Enzymkonjugatlösung pro OT • Inkubation in der feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 26 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min • 60 min
Waschschrift	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min • 5 min
DAB-Färbung	<p>Unter dem Abzug:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pipettieren von je 100 µl DAB-Lösung (1:50) pro OT • Inkubation in der Feuchtkammer • OT in Küvette mit Leitungswasser spülen • OT in Küvette mit Aqua destillata spülen 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 min • 10 sec • 5 min
Hämalaun-Färbung	<ul style="list-style-type: none"> • Schaukel mit OT in Hämalaun stellen • Spülen unter fließendem Leitungswasser • Schaukel mit OT in Küvette mit Aqua destillata stellen 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 sec • 5 min • 5 min
Dehydrierung	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol 50 % • Ethanol 70 % • Ethanol 96 % • Ethanol 96 % 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 min • 3 min • 3 min • 3min

	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol 100 % • Ethanol 100% • Xylol 50 %/Ethanol 50 % • Xylol • Xylol • Xylol 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 min • 3 min • 5 min • 10 min • 10 min • 10 min
Eindecken des Gewebes	<ul style="list-style-type: none"> • Eindecken der OT mit DePex-eindeckmedium und Deckgläschen. • Bei Raumtemperatur und mit Gewichten beschwert trocknen 	<ul style="list-style-type: none"> • Über Nacht

3.3.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Astrozyten bezüglich ihrer Anzahl und Morphologie im Rahmen einer durch Cuprizone induzierten Demyelinisierung zu untersuchen. Für die Auswertung wurden sogenannte "regions of interest" (ROI) im ZNS definiert, die sowohl den Neo- und Archikortex als auch die weiße Substanz miteinschließen und in Tabelle 16 und Abbildung 11 dargestellt sind.

Die 60 gefärbten Schnitte wurden in 40-facher Vergrößerung vollständig eingescannt. Das Einscannen erfolgte manuell über ein Mikroskop (Nikon Eclipse E200, 243194/0) mit Flächenkamera (Basler ace acA1920-40uc, 106910-09) und dem Bildverarbeitungsprogramm ManualWSI Scanner (Microvisioneer, Josef Bauer, Deutschland).

Für die Analyse der eingescannten Schnitte wurde die frei verfügbare Software Viewpoint Online (PreciPoint GmbH, Freising, Deutschland) verwendet. Mithilfe der Funktion „Counting Anotation“ wurden die folgenden Regionen im Gehirn wie in Abbildung 11 umrahmt und die jeweilige Fläche bestimmt.

Es wurden alle Zellen in den ROIs gezählt, welche Antikörper-positiv waren und einen deutlich abgrenzbaren Zellkern sowie mindestens zwei erkennbare Fortsätze aufwiesen. Unter Berücksichtigung der Fläche des ROIs wurde über den Quotienten Zellzahl/Fläche die jeweilige Zelldichte berechnet.

Tabelle 16: Untersuchte Hirnregionen

Abkürzung	Name der Hirnregion
-----------	---------------------

pScx L1-4	Primär somatosensorischer Kortex, Laminae 1 - 4
pScx L5-6a	Primär somatosensorischer Kortex, Laminae 5 - 6a
mCC	Mediales Corpus callosum
ICC	Laterales Corpus callosum
GD	Gyrus dentatus

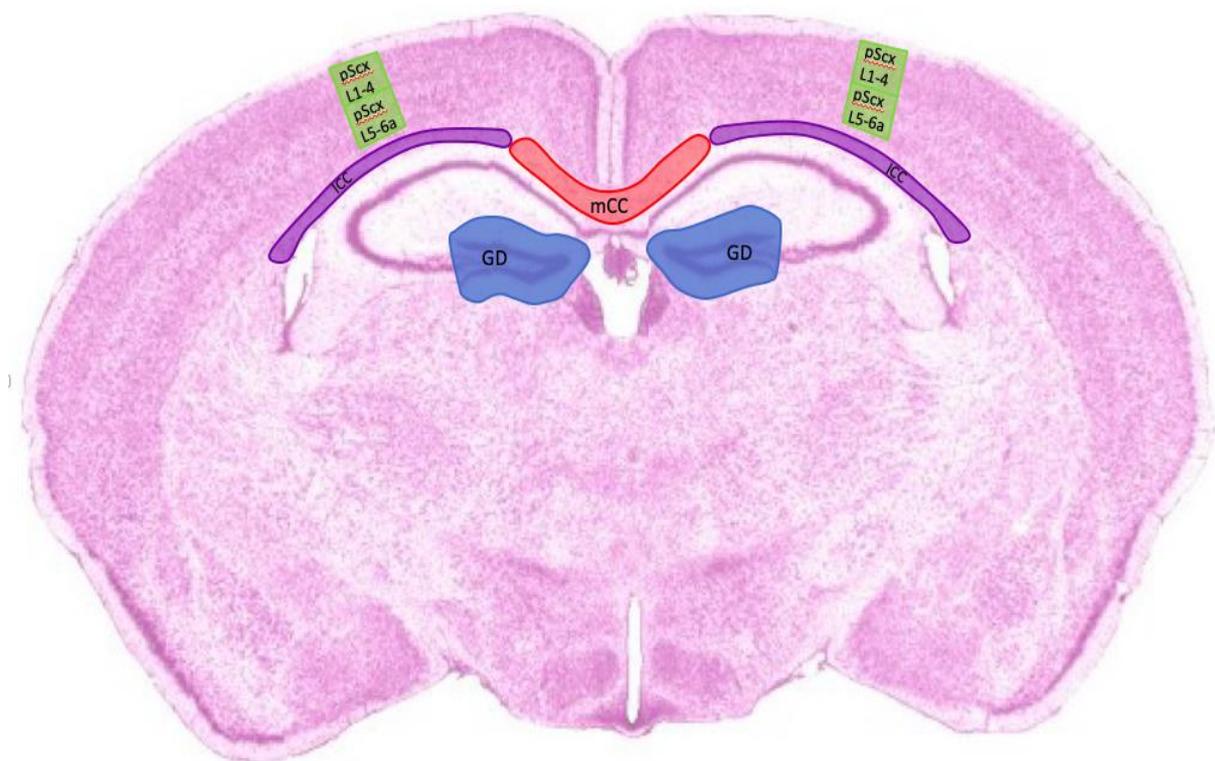
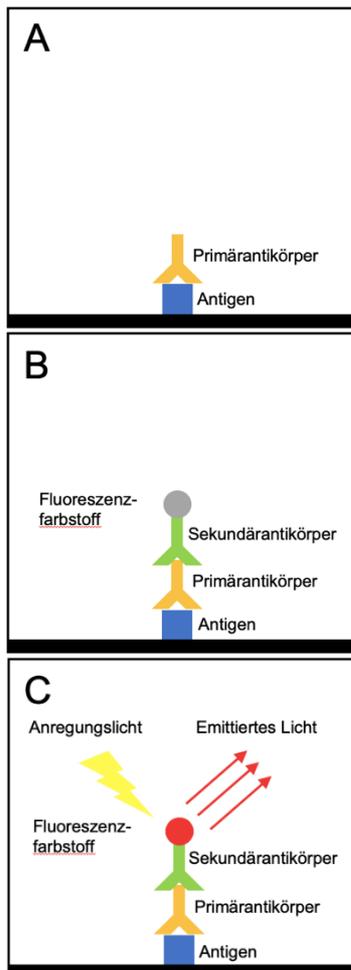


Abbildung 11: Darstellung der untersuchten Hirnregionen nach immunohistochemischer Färbung

3.4 Immunfluoreszenzfärbung

3.4.1 Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung stellt neben der immunhistochemischen Färbung ein weiteres Verfahren zur Detektion von Proteinen im Gewebe dar und beruht auf folgenden Prinzip:



Der Primärantikörper bindet selektiv an das Epitop des gesuchten Proteins im Gewebe (Abbildung 12 **A**).

Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet. Er bindet im zweiten Schritt an den Primärantikörper (Abbildung 12 **B**).

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird der Fluoreszenzfarbstoff zum Leuchten angeregt (Abbildung 12 **C**).

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht zudem die Färbung unterschiedlicher Proteine durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit ALDH1L1 und GFAP durchgeführt.

3.4.2 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Um standardisierte und vergleichbare Farbergebnisse zu erhalten, wurde die Färbung aller Schnitte nach dem gleichen Färbeprotokoll durchgeführt (siehe Tabelle 20).

Der erste Tag des Färbeprotokolls der Immunfluoreszenzfärbung gleicht dem ersten Tag der indirekten ABC-Methode. Die zwei Primärantikörper wurden jeweils simultan über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag der Färbung wurden die beiden fluoreszierenden Sekundärantikörper gleichzeitig auf die Schnitte pipettiert und inkubiert. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, wurden die Objektträger in allen folgenden Schritten vor Lichteinfall geschützt. In einem nächsten Schritt wurden die Schnitte mit DAPI-Lösung inkubiert, um die Zellkerne blau anzufärben. Das Eindecken erfolgte direkt aus dem destilliertem Wasser mit einem Fluoreszenzeindeckmedium. Die Lagerung der fertigen Schnitte erfolgte lichtgeschützt im Kühlschrank, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern.

Die Herstellung der verwendeten Lösungen und das Protokoll der Immunfluoreszenzdoppelfärbung sind in den Tabellen 17 -21 zusammengefasst.

Tabelle 17: Lösungen der Immunfluoreszenzfärbung

Lösung	Herstellung
PBS (10X) Stocklösung	<ul style="list-style-type: none">• 477,75 g PBS-Pulver in 5 L Aqua destillata auflösen• Mit HCl erfolgt die Einstellung auf pH=7,40
PBS (1X) Gebrauchslösung	<ul style="list-style-type: none">• PBS (10X) und Aqua destillata im Verhältnis von 1:10 lösen• Mit HCl erfolgt die Einstellung auf pH=7,40
5 % Normal Goat Serum (NGS)	<ul style="list-style-type: none">• 2,5 ml NGS in 47,5 ml PBS (1X) lösen• Aliquotieren (1 ml) und bei -20 °C lagern
Citrat-Puffer	<ul style="list-style-type: none">• 10,5 g Citrat in 4,5 L Aqua destillata lösen• Mit HCl erfolgt die Einstellung auf pH=6,0
Tris/EDTA-Puffer	<ul style="list-style-type: none">• 6,05 g Tris und 1,85 g EDTA in 5 L Aqua destillata lösen• Mit NaOH erfolgt die Einstellung auf pH=9,0
DAPI Stock A	<ul style="list-style-type: none">• 10 mg Bisbenzimid-DAPI in 1 ml Aqua destillata lösen
DAPI Stock B	<ul style="list-style-type: none">• 10 µg DAPI Stock A in 1 ml Aqua destillata lösen
DAPI-Lösung	<ul style="list-style-type: none">• 50 µl DAPI Stock B in 450 µl Aqua destillata lösen

Tabelle 18: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung	Demaskierung	Lösung
ALDH1L1	Abcam	ab87117	1:1000	Tris/EDTA	5 % NGS
GFAP	Abcam	ab4674	1:1000	Tris/EDTA	5 % NGS

Tabelle 19: Verwendete fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Lösung
Goat anti rabbit Alexa Fluor 488	Life Technologies/Invitrogen	A11008	5 % NGS
Goat anti chicken Alexa Fluor 594	Life Technologies/Invitrogen	A11042	5 % NGS

Tabelle 20: Zuordnung von Primär- zu Sekundärantikörpern

Primärantikörper	Hergestellt in	Passender Sekundärantikörper
ALDH1L1	Rabbit	Goat anti rabbit Alexa Fluor 488
GFAP	Chicken	Goat anti chicken Alexa Fluor 594

Tabelle 21: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

Tag 1		
Arbeitsschritt	Durchführung	Zeit
Entparaffinierung	<ul style="list-style-type: none"> • Xylol • Xylol • Xylol • Xylol 50 %/Ethanol 50 % • Ethanol 100 % • Ethanol 100 % • Ethanol 96 % • Ethanol 96 % • Ethanol 70 % • Ethanol 70 % • Ethanol 50 % • Aqua destillata 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 min • 10 min • 10 min • 5 min • 3 min
Antigendemaskierung (fakultativ)	<ul style="list-style-type: none"> • OT in Plastikkuvette stellen und mit Tris/EDTA- oder Citrat-Puffer füllen. • In der Mikrowelle zum Kochen bringen • Bei reduzierter Leistung köcheln • Abkühlen im Wasserbad bei Raumtemperatur 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 min • 10 min • 20 min
Waschschritt	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min • 5 min
Blockierung	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettieren von je 100 µl 5 % NGS pro OT • Inkubation in der feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 26 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • 60 min
Inkubation der Primärantikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettieren von je 100 µl Primärantikörperlösung pro OT 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubation in der feuchten Kammer im Kühlschrank bei 4 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • Über Nacht
Tag 2		
Waschschritt	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min • 5 min
Inkubation der fluoreszierenden Sekundärantikörper (Lichtgeschützt)	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettieren von je 100 µl Sekundärantikörperlösung pro OT • Inkubation in der feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 26 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • 60 min
Waschschritt (Lichtgeschützt)	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min • 5 min
Avidin/Biotin-HRP-Komplex (Lichtgeschützt)	<ul style="list-style-type: none"> • Enzymkonjugat aus A und B je 1:50 in PBS (1X) verdünnt herstellen und lichtgeschützt lagern • Pipettieren von je 100 µl Enzymkonjugatlösung pro OT • Inkubation in der feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 26 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min • 60 min
Waschschritt (Lichtgeschützt)	<ul style="list-style-type: none"> • PBS (1X) • PBS (1X) • PBS (1X) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 min • 5 min • 5 min
DAPI-Färbung (Lichtgeschützt)	<p>Unter dem Abzug:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pipettieren von je 100 µl DAPI-Lösung (1:50) pro OT • Inkubation in der Feuchtkammer • OT in Küvette mit Leitungswasser spülen • OT in Küvette mit Aqua destillata spülen 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 min • 10 sec • 5 min
Hämalaun-Färbung	<ul style="list-style-type: none"> • Schaukel mit OT in Hämalaun stellen • Spülen unter fließendem Leitungswasser • Schaukel mit OT in Küvette mit Aqua destillata stellen 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 sec • 5 min • 5 min
Dehydrierung	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol 50 % • Ethanol 70 % • Ethanol 96 % • Ethanol 96 % • Ethanol 100 % • Ethanol 100 % • Xylol 50%/Ethanol 50 % • Xylol • Xylol • Xylol 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 min • 5 min • 10 min • 10 min • 10 min
Eindecken des Gewebes (Lichtgeschützt)	<ul style="list-style-type: none"> • Eindecken der OT mit DePex-eindeckmedium und Deckgläschen. • Bei Raumtemperatur trocknen 	<ul style="list-style-type: none"> • Über Nacht

3.4.3 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurden folgende ROIs definiert, die in Tabelle 22 und Abbildung 13 dargestellt sind:

Tabelle 22: Untersuchte Hirnregionen

Abkürzung	Name der Hirnregion
pScx L1 - 2	Primär somatosensorischer Kortex, Laminae 1 - 2
pScx L3 - 4	Primär somatosensorischer Kortex, Laminae 3 - 4
pScx L5-6a	Primär somatosensorischer Kortex, Laminae 5 - 6a
ICC	Laterales Corpus callosum
GD	Gyrus dentatus

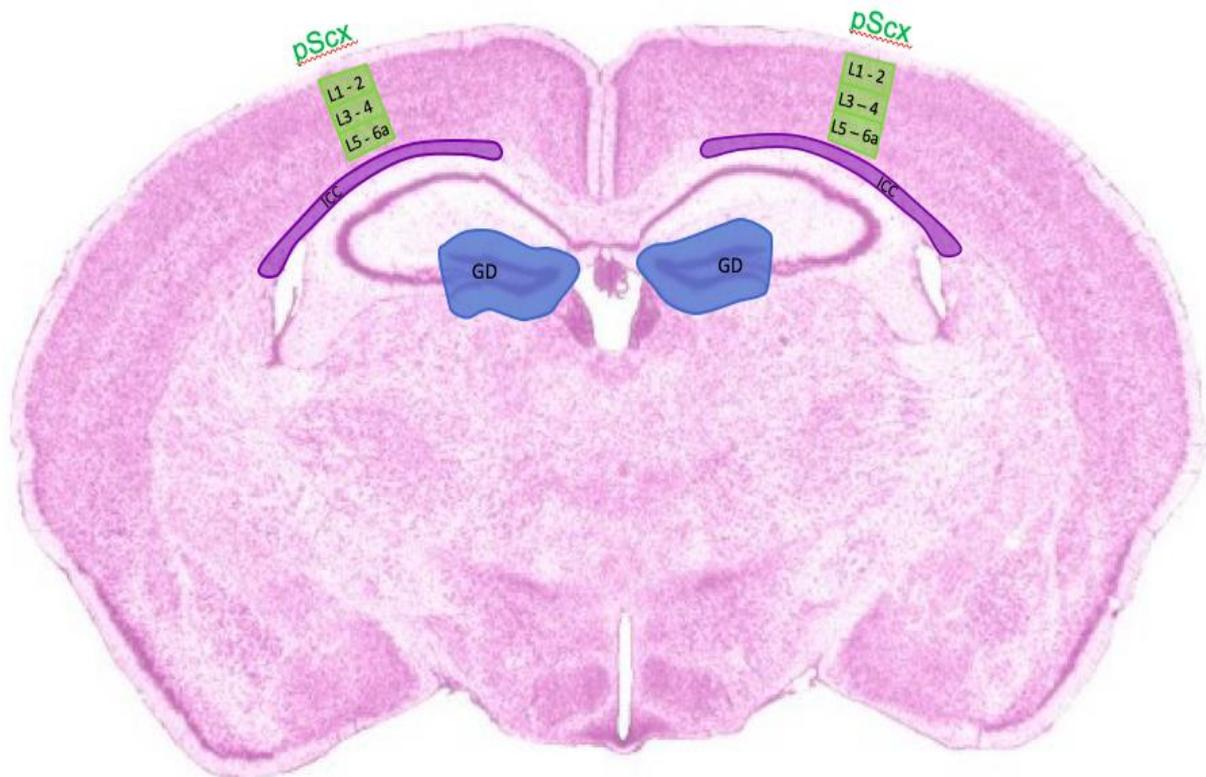


Abbildung 13: Darstellung der untersuchten Hirnregionen nach Immunfluoreszenzfärbung

Die angefertigten Fluoreszenzdoppelfärbungen wurden mit einem Konfokal-Mikroskop (DSU Olympus BX51WI) in 40-facher Vergrößerung eingescannt. Dabei wurde immer eine Hemisphäre pro Schnitt in drei Farbkanälen (blau, rot und grün) eingescannt.

Die Analyse der eingescannten Schnitte wurde mithilfe des Programms Stereo Investigator durchgeführt. Mithilfe der Funktion „roi“ wurden die folgenden Regionen im Gehirn wie in Abbildung 13 umrahmt und die jeweilige Fläche bestimmt.

Es wurde die Anzahl folgender Zellen in den ROIs bestimmt: ALDH1L1⁺/GFAP⁻, ALDH1L1⁻/GFAP⁺ und ALDH1L1⁺ /GFAP⁺ Zellen. Unter Berücksichtigung der Fläche des ROIs wurde über den Quotienten Zellzahl/Fläche die jeweilige Zelldichte berechnet.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der bestimmten Zelldichten erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism (Version 8.4.3 für Mac, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

Alle Daten sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM = Standard Error of the Mean) angegeben.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit einem ungepaarten T-Test, gefolgt von einer Welch-Korrektur auf Signifikanz getestet.

P-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Zur Angabe des Signifikanzniveaus wurden die folgenden Symbole verwendet: * $p \leq .05$, ** $p \leq .01$, *** $p \leq .001$, ns = nicht signifikant.

4. Ergebnisse

Das Cuprizone-Modell dient der reproduzierbaren Untersuchung neurodegenerativer Teilaspekte der MS und stellt Begleitreaktion wie Astrozyten- und Mikrogliaaktivierung dar.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden der primär somatosensorischer Kortex, das *Corpus callosum* und der *Gyrus dentatus* des *Hippocampus* als "region of interest" hinsichtlich der Astrozyten und ihrer Reaktion auf die stattgefundene Demyelinisierung durch Cuprizone beurteilt.

Nach 5-wöchiger Behandlung der Tiere mit 0,25 % Cuprizone wurde die Expression der fünf verwendeten Antikörper GFAP, ALDH1L1, Vimentin, BLBP und S100 β im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht und ausgewertet.

4.1 Erhöhte GFAP-Expression in neokortikalen Astrozyten und Astrozyten der weißen Substanz nach Toxin-induzierter Demyelinisierung

Unter Kontrollbedingungen konnten in allen analysierten Hirnregionen GFAP⁺ Astrozyten ähnlicher Morphologie beobachtet werden. Wenn Zellkörper angeschnitten wurden, waren diese rund und GFAP⁺, zudem zeigten sich lange GFAP⁺ Zellfortsätze (Abbildung 14 H).

Bereits in den Gehirnen der Kontrolltiere zeigten die Astrozyten des *Gyrus dentatus* eine hohe GFAP-Expression (Abbildung 14 G, 14 M). Im Gegensatz dazu konnte im *Corpus callosum* nur eine geringe und im primär somatosensorischen Kortex keine wesentliche astrozytäre GFAP-Expression beobachtet werden (Abbildung 14 B, 14 E, 14 K, 14 M).

Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigten die Astrozyten im *Corpus callosum* und in den angrenzenden kortikalen Schichten einen aktivierten Phänotyp mit geschwollenem Zellkörper und verdickten GFAP⁺ Zellfortsätzen (Abbildung 14 D, 14 F).

In den oberflächlichen Schichten des primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* ließ sich keine Veränderung der Astrozytenmorphologie und der GFAP-Positivität im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (Abbildung 14 J, 14 L).

Hinsichtlich der Zelldichte konnten zwei unterschiedliche Tendenzen beobachtet werden: Im *Corpus callosum* und im primär somatosensorischen Kortex zeigte sich ein starker Anstieg der Dichte GFAP⁺ Astrozyten. Im *Gyrus dentatus* blieb die Dichte GFAP⁺ Astrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (Abbildung 14 M).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die anti-GFAP-Immunhistochemie eine sensitive Methode für die Visualisierung aktivierter neokortikaler Astrozyten und Astrozyten der weißen Substanz darstellt. Eine Aktivierung archikortikaler Astrozyten konnte mittels anti-GFAP-Immunhistochemie nicht festgestellt werden.

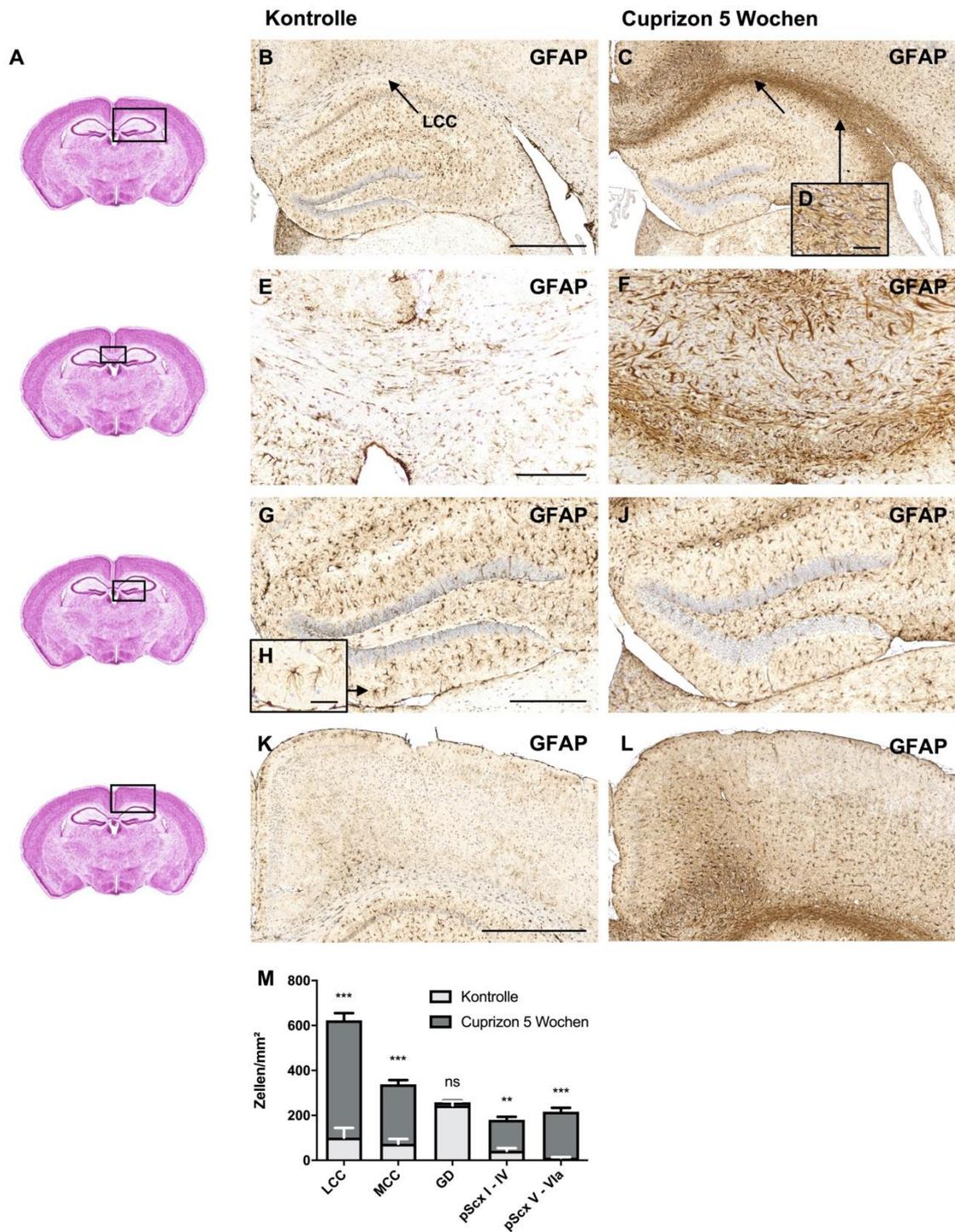


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von GFAP vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des rostralen Hippokampus in der Übersicht (Sidman et al., 1971). (B) und (C), (E) und (F), (G) und (J) sowie (K) und (L) zeigen eine anti-GFAP immunhistochemische Färbung des lateralen (LCC) und medialen Corpus callosum (MCC), des Gyrus dentatus (GD) sowie des primär somatosensorischen Kortex (pScx) bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. (D) zeigt beispielhaft einen aktivierten Astrozyten bei Cuprizone-behandelten Tieren. (H) zeigt beispielhaft einen Astrozyten im Kontrolltier. (M) zeigt die Dichte GFAP⁺ Astrozyten in den Kontrolltieren und nach Cuprizone-Behandlung in den betrachteten Hirnregionen. Die Abbildungen zeigen nach Cuprizone-Intoxikation einen deutlichen Anstieg der GFAP-Expression und eine Astrozytenaktivierung im Corpus callosum und im primär somatosensorischen Kortex. Maßstab = 1000 μ m (B, C, K, L); Maßstab = 500 μ m (G, J); Maßstab = 100 μ m (E, F); Maßstab = 25 μ m (D, H)

4.2 Erhöhte ADLH1L1-Expression in Astrozyten der weißen Substanz nach Toxin-induzierter Demyelinisierung

In Tieren der Kontrollgruppe ließen sich zwei morphologisch unterschiedliche ADLH1L1⁺ Astrozytenpopulationen voneinander abgrenzen. Typ 1 zeichnete sich durch einen ADLH1L1-freien Zellkörper aus. Vom Zellkörper ausgehend waren dünne, meist verzweigte ALDH1L1⁺ Zellfortsätze im Territorium des Astrozyten sichtbar (Abbildung 15 **K**). Typ 2 besaß einen ADLH1L1⁺ Zellkörper, wohingegen die Fortsätze und ihre Verzweigungen keine anti-ALDH1L1-Immunreaktivität aufwiesen (Abbildung 15 **L**).

Unter Kontrollbedingungen zeigten die Astrozyten des *Corpus callosum* keine ADLH1L1-Expression (Abbildung 15 **B**, 15 **D**, 15 **P**). Anders verhielt es sich in neo- und archikortikalen Schichten. Sowohl im primär somatosensorischen Kortex als auch im *Gyrus dentatus* konnte eine hohe astrozytäre ADLH1L1-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 15 **G**, 15 **J**, 15 **P**).

Die anti-ADLH1L1-Immunreaktivität zeigte in den untersuchten Hirnregionen der Kontrolltiere eine ungleichmäßige Verteilung. So ließen sich im Bereich des primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* fleckförmige, komplett ADLH1L1-freie Bereiche nachweisen, welche oftmals Gefäße umrahmten (Abbildung 15 **G**, 15 **J**).

Nach 5-wöchiger Cuprizone-Behandlung der Tiere zeigten sich insbesondere in den tiefen Schichten des primär somatosensorischen Kortex und im *Corpus callosum* mehr (Hyperplasie) und größere (Hypertrophie) ADLH1L1⁺ Astrozyten. Die Zellen zeigten den Phänotyp eines aktivierten Astrozyten mit deutlich vergrößertem ADLH1L1⁺ Zellkörper und geschwollenen ADLH1L1⁺ Fortsätzen (Abbildung 15 **F**, 15 **N**).

In den oberflächlichen Schichten des primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* konnte augenscheinlich keine Veränderung der Astrozytenmorphologie im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Im *Corpus callosum* kam es zu einem deutlichen Anstieg der Dichte ADLH1L1⁺ Astrozyten, wohingegen im primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* nur eine geringe Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen war (Abbildung 15 **P**).

Die bereits in der Kontrollgruppe beschriebenen ADLH1L1-freien Bereiche im *Gyrus dentatus* und primär somatosensorischen Kortex waren nach Cuprizone-Intoxikation nicht mehr vorzufinden (Abbildung 15 **H**, 15 **M**).

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass die anti-ADLH1L1-Immunhistochemie ein sensitives Verfahren für den Nachweis aktivierter Astrozyten in der weißen Substanz darstellt. Die Aktivierung archi- und neokortikaler Astrozyten ließ sich nicht ausreichend visualisieren.

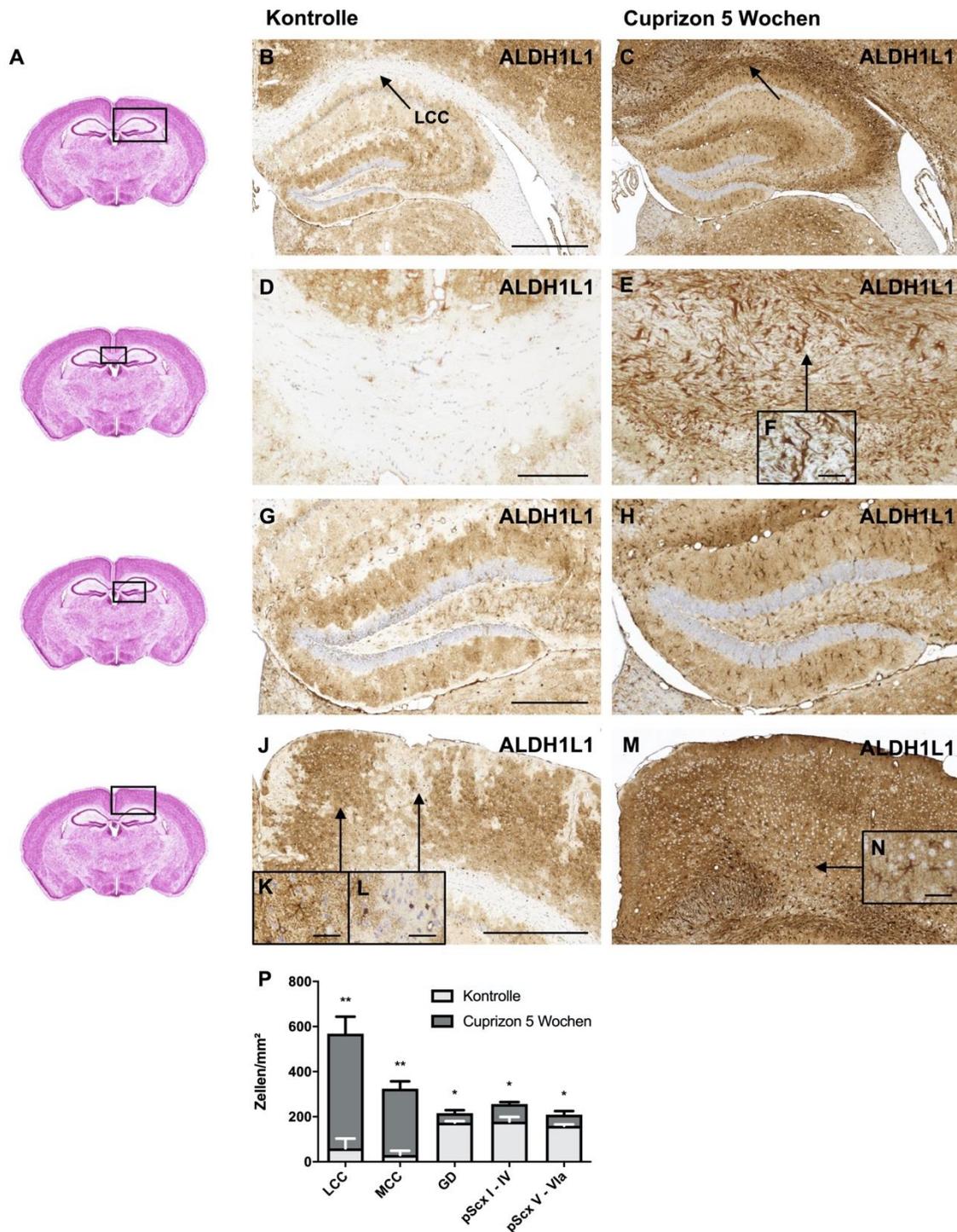


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von ALDH1L1 vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des rostralen Hippokampus in der Übersicht (Sidman et al., 1971). (B) und (C), (D) und (E), (G) und (H) sowie (J) und (M) zeigen eine anti-ALDH1L1 immunhistochemische Färbung des lateralen (LCC) und medialen Corpus callosum (MCC), des Gyrus dentatus (GD) sowie des primär somatosensorischen Kortex (pScx) bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. (F) und (N) zeigen beispielhaft aktivierte Astrozyten bei Cuprizone-behandelten Tieren. (H) und (K) zeigen beispielhaft ALDH1L1+ Astrozyten vom Typ 1 und Typ 2. (P) zeigt die Dichte ALDH1L1+ Astrozyten in den Kontrolltieren und nach Cuprizone-Behandlung in den betrachteten Hirnregionen. Die Abbildungen zeigen nach Cuprizone-Intoxikation einen deutlichen Anstieg der ALDH1L1-Expression und eine Astrozytenaktivierung im Corpus callosum.

Maßstab = 1000 µm (B, C, J, M); Maßstab = 500 µm (G, H); Maßstab = 100 µm (D, E); Maßstab = 25 µm (F, K, L, N)

4.3 Kolokalisation von ADLH1L1 und GFAP in Astrozyten nach Toxin-induzierter Demyelinisierung

In einer weiteren Untersuchung wurde die ADLH1L1- und GFAP-Expression in Astrozyten von Tieren, die 5 Wochen mit Cuprizone behandelt wurden, verglichen.

Hierzu führten wir eine anti-ADLH1L1/anti-GFAP Immunfluoreszenzdoppelfärbung durch, welche eine Kolokalisation von ADLH1L1 und GFAP in Astrozyten ermöglichte.

ADLH1L1⁺/GFAP⁺ Astrozyten zeigten einen ADLH1L1⁻/GFAP⁻ Zellkörper und ADLH1L1⁺/GFAP⁺ Zellfortsätze. Im primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* konnten zudem ADLH1L1⁺/GFAP⁺ Verzweigungen der Zellfortsätze beobachtet werden (Abbildung 16 B, 16 C).

Im Bereich des primär somatosensorischen Kortex konnten viele ADLH1L1⁺ Astrozyten und wenige GFAP⁺ Astrozyten beobachtet werden. Nur ein sehr geringer Anteil der Astrozyten exprimierte sowohl ADLH1L1 als auch GFAP und war somit doppelt-positiv (Abbildung 16 D). Anders verhielt es sich in im *lateralen Corpus callosum* und im *Gyrus dentatus*. In beiden Regionen konnten viele ADLH1L1⁺ und nur geringfügig weniger GFAP⁺ Astrozyten nachgewiesen werden, von denen ein Großteil ADLH1L1 und GFAP koexprimierte (Abbildung 16 D).

Insgesamt konnten die Untersuchungen zeigen, dass aktivierte Astrozyten der weißen Substanz und des Archikortex häufig ADLH1L1 und GFAP koexprimieren. Im Neokortex hingegen konnten nur wenige ADLH1L1⁺/GFAP⁺ Astrozyten beobachtet werden, die meisten Astrozyten stellten sich ADLH1L1⁺/GFAP⁻ dar.

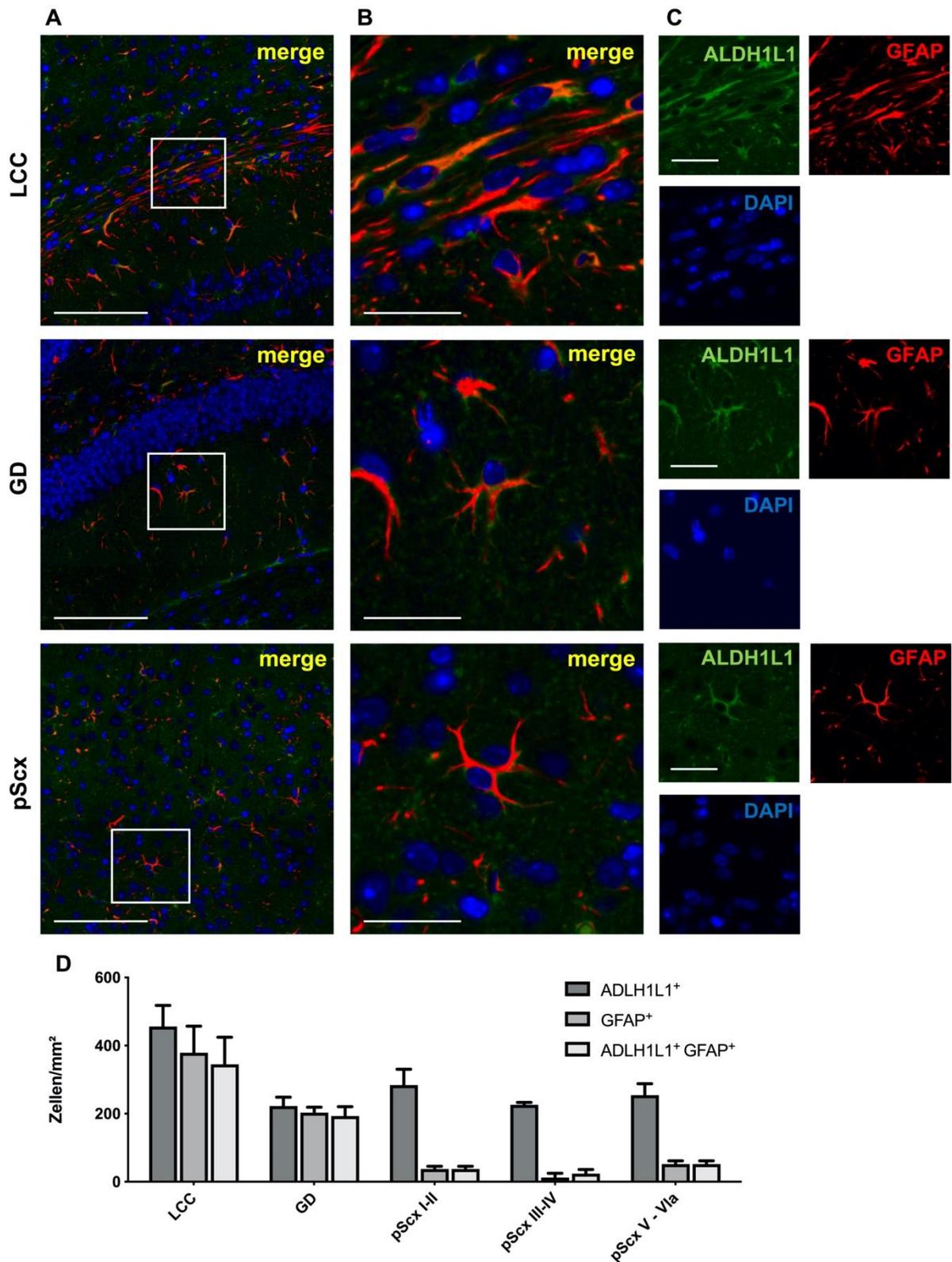


Abbildung 16: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit ADLH1L1 und GFAP nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit ADLH1L1 (rot) und GFAP (grün) nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation im lateralen Corpus callosum (LCC), im Gyrus dentatus (GD) und im primär somatosensorischen Kortex (pScx). Die weißen Boxen veranschaulichen ADLH1L1⁺/GFAP⁺ Astrozyten welche in **(B)** und **(C)** in höherer Auflösung gezeigt werden. **(D)** zeigt die Zelldichte ADLH1L1⁺, GFAP⁺ und ADLH1L1⁺/GFAP⁺ Astrozyten nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. Maßstab = 100 µm **(A)**; Maßstab = 25 µm **(B,C)**

4.4 Erhöhte Vimentin-Expression in archi- und neokortikalen Astrozyten und Astrozyten der weißen Substanz nach Toxin-induzierter Demyelinisierung

Unter Kontrollbedingungen zeigten sich in allen analysierten Hirnregionen Vimentin⁺ Astrozyten ähnlicher Morphologie. Sie zeichneten sich durch einen Vimentin⁻ Zellkörper und durch Vimentin⁺, stark verzweigte Zellfortsätze aus (Abbildung 17 H).

Eine moderate astrozytäre Vimentin-Expression konnte im *Corpus callosum*, im *Gyrus dentatus* und den oberen Schichten des primär somatosensorischen Kortex beobachtet werden. In den tiefen Schichten des primär somatosensorischen Kortex befanden sich keine Vimentin exprimierenden Astrozyten (Abbildung 17 B, 17 D, 17 G, 17 K, 17 M).

Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation nahm die Vimentin-Positivität der Astrozyten im *Corpus callosum* und im *Gyrus dentatus* stark zu. Auf morphologischer Ebene zeigte sich ein aktivierter Phänotyp mit stark geschwollenem Zellkörper und verlängerten, sowie verdickten astrozytären Zellfortsätzen (Abbildung 17 F).

Im primär somatosensorischen Kortex konnte hingegen keine Veränderung der Astrozytenmorphologie im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Im *Corpus callosum* und im *Gyrus dentatus* sowie in den tiefen Schichten des primär somatosensorischen Kortex kam es zu einem deutlichen Anstieg der Dichte Vimentin⁺ Astrozyten, wohingegen in den oberflächlichen Schichten des primär somatosensorischen Kortex keine wesentliche Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen war (Abbildung 17 C, 17 E, 17 J, 17 L, 17 M).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die anti-Vimentin-Immunhistochemie eine sensitive Methode für die Visualisierung aktivierter archikortikaler Astrozyten, Astrozyten tiefer kortikaler Schichten und Astrozyten der weißen Substanz darstellt. Für den Nachweis aktivierter neokortikaler Astrozyten der oberflächlichen Schichten erwies sich die anti-Vimentin-Immunhistochemie als ungeeignet.

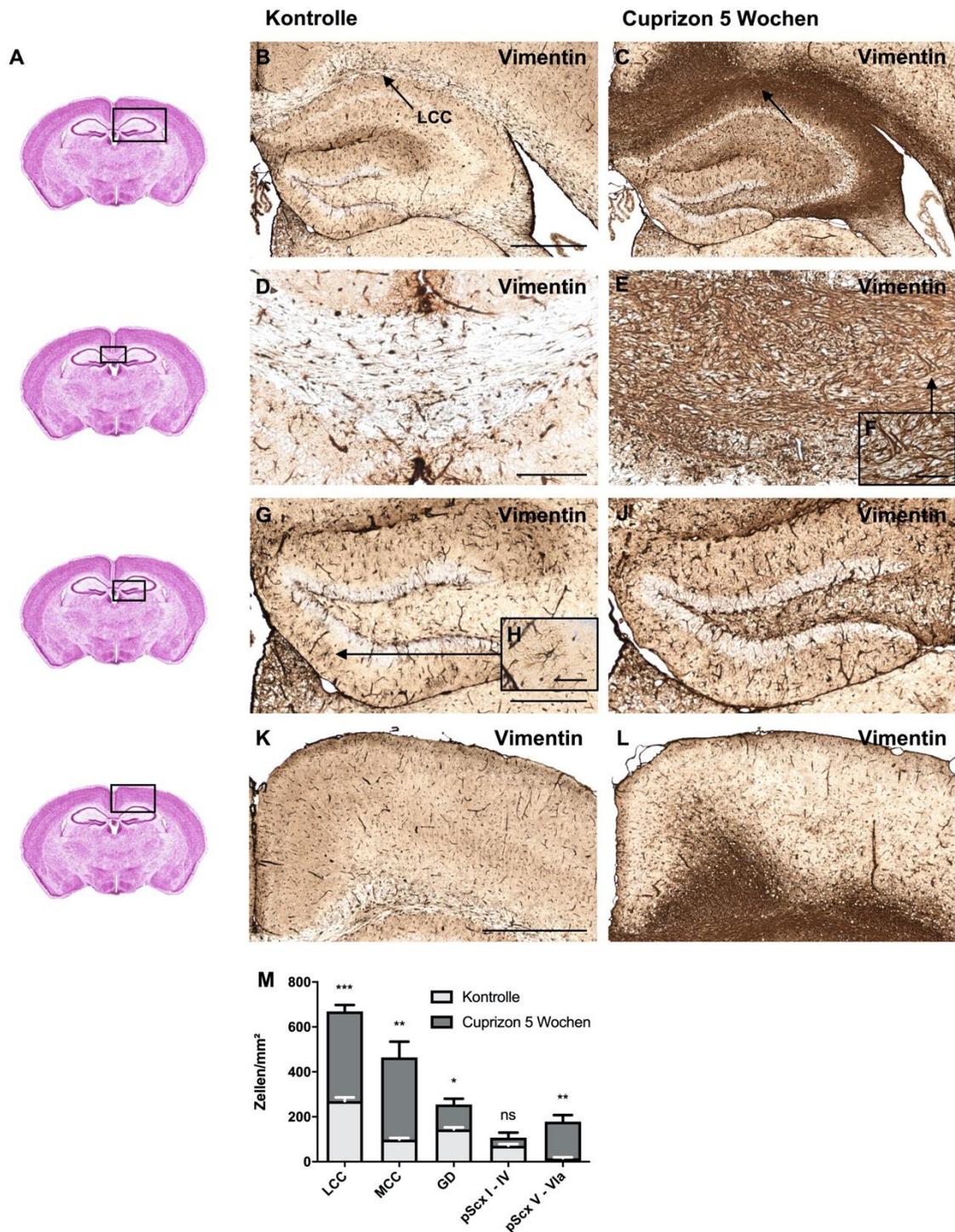


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des rostralen Hippokampus in der Übersicht (Sidman et al., 1971). (B) und (C), (D) und (E), (G) und (J) sowie (K) und (L) zeigen eine anti-Vimentin immunhistochemische Färbung des lateralen (LCC) und medialen Corpus callosum (MCC), des Gyrus dentatus (GD) sowie des primär somatosensorischen Kortex (pScx) bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. (F) zeigt beispielhaft einen aktivierten Astrozyten bei Cuprizone-behandelten Tieren. (H) zeigt beispielhaft einen Astrozyten im Kontrolltier. (M) zeigt die Dichte Vimentin⁺ Astrozyten in den Kontrolltieren und nach Cuprizone-Behandlung in den betrachteten Hirnregionen. Die Abbildungen zeigen nach Cuprizone-Intoxikation einen deutlichen Anstieg der Vimentin-Expression und der Astrozytenaktivierung in allen betrachteten Hirnregionen mit Ausnahme der Laminae I - IV des pScx. Maßstab = 1000 μm (B, C, K, L); Maßstab = 500 μm (G, J); Maßstab = 100 μm (D, E); Maßstab = 25 μm (F, H)

4.5 Erhöhte BLBP-Expression in Astrozyten der weißen Substanz und Astrozyten tiefer neokortikaler Schichten nach Toxin-induzierter Demyelinisierung

Unter Kontrollbedingungen konnten zwei unterschiedliche BLBP⁺ Astrozytenpopulationen beobachtet werden. Typ 1 zeigte einen BLBP-freien Zellkörper und BLBP⁺ Primärfortsätze ohne weitere Verzweigungen (Abbildung 18 H). Astrozyten vom Typ 2 wiesen einen rundlichen, BLBP⁺ Zellkörper auf, ohne dass eine Färbung von Zellfortsätzen ersichtlich wurde (Abbildung 18 M).

Astrozyten des primär somatosensorischen Kortex und des *Gyrus dentatus* zeigten in den Kontrolltieren eine mäßige BLBP-Expression (Abbildung 18 G, 18 L, 18 P). Im *Corpus callosum* konnte keine astrozytäre BLBP-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 18 B, 18 D, 18 P).

Nach 5-wöchiger Intoxikation mit Cuprizone kam es zu einer starken Hyperplasie und Hypertrophie der Astrozyten im *Corpus callosum* und in den tiefen Schichten des primär somatosensorischen Kortex. Die Astrozyten zeigten einen aktivierten Phänotyp mit stark geschwollenen BLBP⁺ Zellkörpern und verlängerten BLBP⁺ Fortsätzen (Abbildung 18 F).

Im *Gyrus dentatus* und in den oberflächlichen Schichten des primär somatosensorischen Kortex konnte nur eine geringe Aktivierung der Astrozyten beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sie eine geringe Hypertrophie der Zellkörper und Zellfortsätze (Abbildung 18 K).

Im *Corpus callosum* kam es zu einem starken Anstieg der Dichte BLBP⁺ Astrozyten (Abbildung 18 C, 18 E, 18 P), wohingegen im primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* nur eine geringe Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen war (Abbildung 18 J, 18 N, 18 P).

Die Untersuchungen zeigten, dass die anti-BLBP-Immunhistochemie ein geeignetes Verfahren für den Nachweis aktivierter Astrozyten in der weißen Substanz und in den tiefen Schichten des primär somatosensorischen Kortex darstellt. Für die Darstellung aktivierter archikortikaler Astrozyten und Astrozyten oberflächlicher Kortexschichten zeigte sich das Verfahren nur bedingt geeignet.

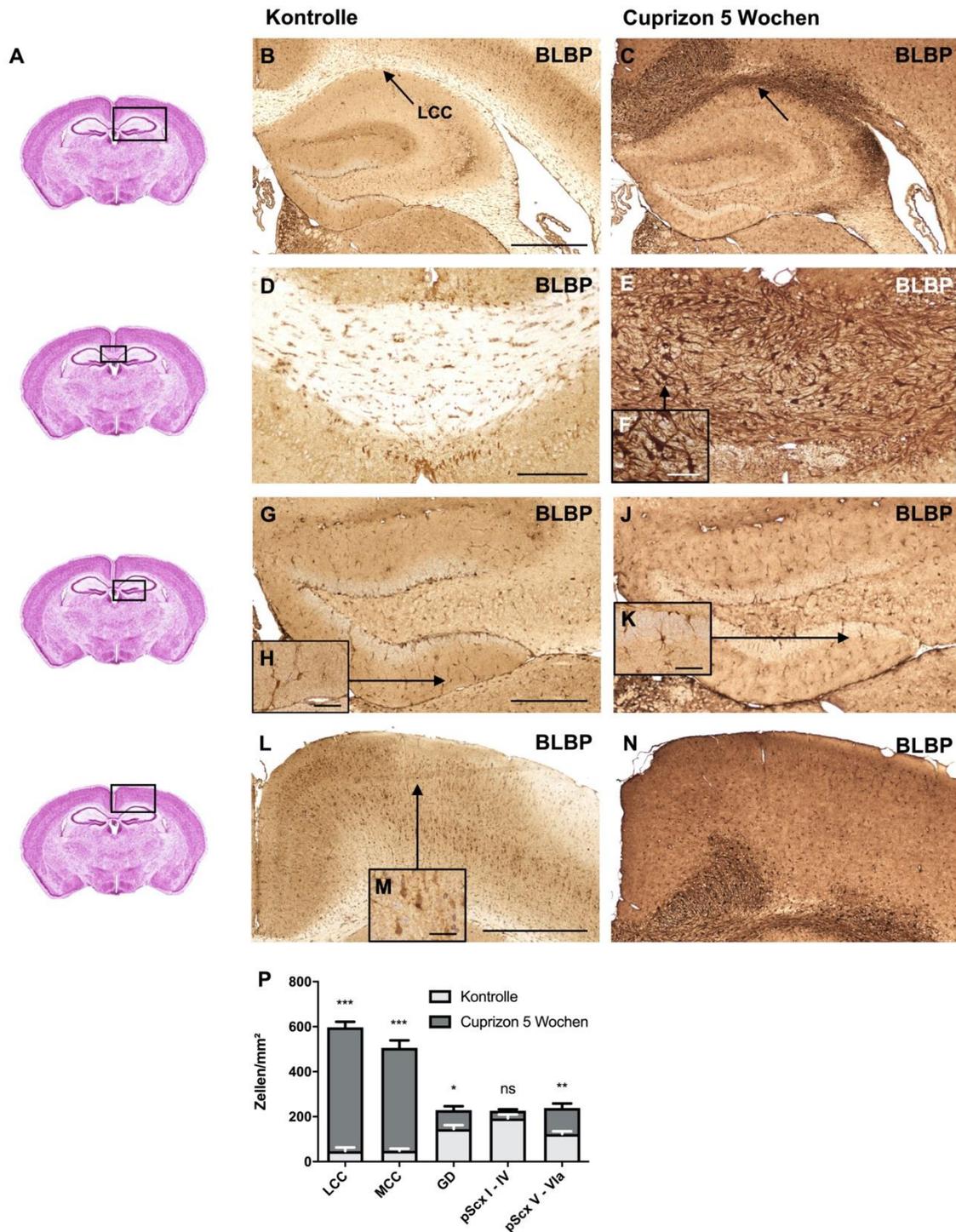


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von BLBP vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des rostralen Hippokampus in der Übersicht. (B) und (C), (D) und (E), (G) und (J) sowie (L) und (N) zeigen eine anti-BLBP immunhistochemische Färbung des lateralen (LCC) und medialen Corpus callosum (MCC), des Gyrus dentatus (GD) sowie des primär somatosensorischen Kortex (pScx) bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. (F) und (K) zeigen beispielhaft aktivierte Astrozyten bei Cuprizone-behandelten Tieren. (H) und (M) zeigen beispielhaft BLBP⁺ Astrozyten vom Typ 1 und Typ 2. (P) zeigt die Dichte BLBP⁺ Astrozyten in den Kontrolltieren und nach Cuprizone-Behandlung in den betrachteten Hirnregionen. Die Abbildungen zeigen nach Cuprizone-Intoxikation einen deutlichen Anstieg der BLBP-Expression und eine Astrozytenaktivierung im Corpus callosum.

Maßstab = 1000 µm (B, C, L, N); Maßstab = 500 µm (G, J); Maßstab = 100 µm (D, E); Maßstab = 25 µm (F, H, K, M)

4.6 Keine erhöhte S100 β -Expression in Astrozyten nach Toxin-induzierter Demyelinisierung

In den Tieren der Kontrollgruppe zeigten sich in allen analysierten Hirnregionen mäßig S100 β ⁺ Astrozyten mit S100 β ⁺ Zellkörpern und Primärfortsätzen (Abbildung 19 J).

Zudem konnte im primär somatosensorischen Kortex, im *Gyrus dentatus* und im *lateralen Corpus callosum* eine deutliche astrozytäre S100 β -Expression beobachtet werden (Abbildung 19 B, 19 F, 19 H, 19 N). Im *medialen Corpus callosum* ließ sich nur eine moderate S100 β -Expression der Astrozyten feststellen (Abbildung 19 D, 19 N).

Nach 5-wöchiger Intoxikation mit Cuprizone konnte keine Zunahme der S100 β -Positivität der Astrozyten beobachtet werden. Es kam zu keiner Veränderung des Phänotyps der S100 β ⁺ Astrozyten. Zudem konnte keine wesentliche Veränderung der astrozytären S100 β -Expression festgestellt werden, die Dichte S100 β ⁺ Astrozyten bleibt unverändert (Abbildung 19 C, 19 E, 19 G, 19 L, 19 N).

Insgesamt konnten die Untersuchungen zeigen, dass die anti-S100 β -Immunhistochemie kein geeignetes Verfahren für den Nachweis aktivierter Astrozyten im Cuprizon-Modell darstellt.

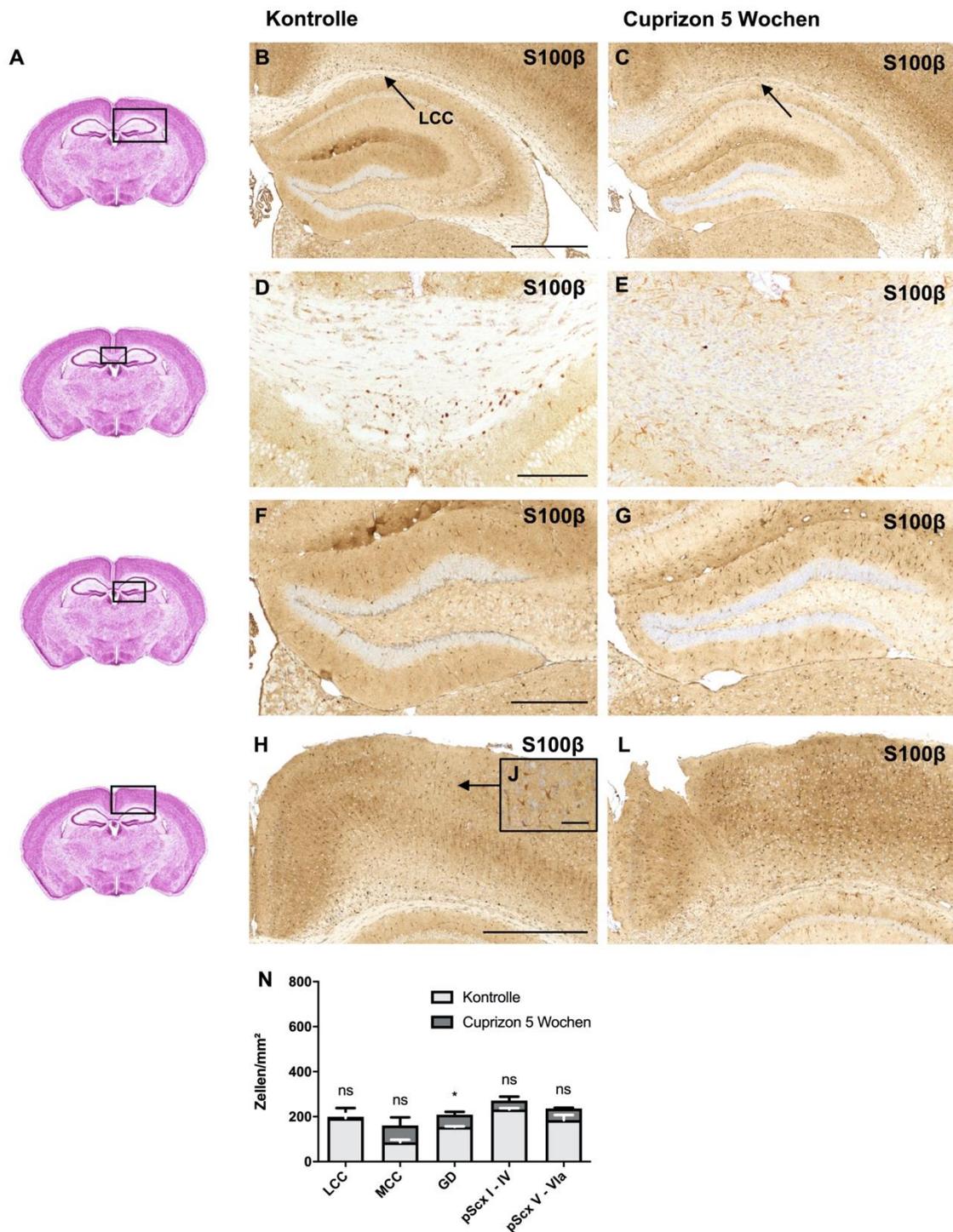


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von S100β vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation

(A) zeigt eine HE-Färbung auf Höhe des rostralen Hippokampus in der Übersicht (Sidman et al., 1971). (B) und (C), (D) und (E), (F) und (G) sowie (H) und (L) zeigen eine anti-S100β immunhistochemische Färbung des lateralen (LCC) und medialen Corpus callosum (MCC), des Gyrus dentatus (GD) sowie des primär somatosensorischen Kortex (pScx) bei einem Kontrolltier und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. (M) zeigt beispielhaft einen aktivierten Astrozyten bei Cuprizone-behandelten Tieren. (J) und (K) zeigen beispielhaft Astrozyten vom Typ 1 und Typ 2.

(N) zeigt die Dichte S100β+ Astrozyten in den Kontrolltieren und nach Cuprizone-Behandlung in den betrachteten Hirnregionen. Die Abbildungen zeigen nach Cuprizone-Intoxikation keinen Anstieg der S100β-Expression und keine Astrozytenaktivierung.

Maßstab = 1000 µm (B, C, H, L); Maßstab = 500 µm (F, G); Maßstab = 100 µm (D, E); Maßstab = 25 µm (J, K, M)

5. Diskussion

5.1 Astrozyten und ihre Rolle in der Pathogenese der MS

Die MS ist eine erworbene, chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die zur Ausbildung entzündlicher Läsionen in der weißen und grauen Substanz führt. Obwohl weltweit etwa 2 Millionen Menschen von MS betroffen sind, ist es bis heute noch nicht gelungen, die Pathogenese der MS genau zu klären (Kingwell et al., 2013).

Zahlreiche Forschungsarbeiten konnten bislang nur Therapieansätze entwickeln, die eine Symptomlinderung oder eine Verlangsamung des Fortschreitens des Krankheitsverlaufs herbeiführen (Steinman & Zamvil, 2006). Eine Heilung der MS ist bis heute nicht möglich.

Um den Pathomechanismus der MS zu verstehen und therapeutische Ansätze entwickeln zu können, bedient man sich experimenteller Tiermodelle. Bislang wurden eine Vielzahl an experimentellen Tiermodellen entwickelt, da es bisher nicht möglich ist, alle Teilaspekte der MS-Erkrankung in einem einzigen Tiermodell abzubilden.

Ein wichtiges, im Rahmen dieser Arbeit verwendete Modell, ist das Cuprizone-Modell, welches den neurodegenerativen Teilaspekt der MS unter Ausschluss autoimmunvermittelter, inflammatorischer Prozesse darstellt.

Astrozyten bilden die Mehrheit der Makroglia im ZNS und erfüllen dort vielfältige Funktionen. So spielen sie eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Gehirnes (Powell & Geller, 1999; Ullian et al., 2001) und sichern die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Sofroniew, 2015). Zudem regulieren Astrozyten zahlreiche Stoffwechselfunktionen des ZNS (Ransohoff & Brown, 2012) und die neuronal synaptische Übertragung (Santello & Volterra, 2010; Ventura & Harris, 1999). Astrozyten reagieren auf Schädigungen des Gehirns mit einer reaktiven Astroglie. Die Veränderung findet sowohl auf zellulärer, funktioneller und molekularer Ebene statt (Farina et al., 2007; Rothhammer & Quintana, 2015) und äußert sich morphologisch durch Proliferation, Hypertrophie und Ausbildung einer Glianarbe (Faulkner et al., 2004; Pekny & Nilsson, 2005). Astrozyten sind maßgeblich an der Pathogenese der MS beteiligt. Jüngste Beobachtungen haben gezeigt, dass Astrozyten bereits früh und aktiv an der Krankheitsentstehung teilnehmen (Farina et al., 2007; Ponath et al., 2017; Sofroniew, 2015) und somit weit mehr Aufgaben erfüllen, als nur die Ausbildung einer Glianarbe nach abgeschlossener Demyelinisierung. Astrozyten rekrutieren Lymphozyten (Farina et al., 2007; Ransohoff & Brown, 2012) und tragen zur Gewebsschädigung bei (Káradóttir, Cavelier, Bergersen, & Attwell, 2005; Pitt, Werner, & Raine, 2000; T. Smith, Groom, Zhu, & Turski, 2000). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Astrozyten antiinflammatorisch wirken und die Reparatur von MS-Läsionen fördern (Sofroniew, 2015).

5.2 Astrozyten sind eine heterogene Zellpopulation im Cuprizone-Modell

Mehrere Indizien deuten darauf hin, dass Astrozyten eine heterogene Zellpopulation darstellen. Bereits 1918 konnte gezeigt werden, dass es zwei Astrozytenpopulationen gibt, die sich in ihrer Morphologie voneinander unterscheiden (de Gruyter, 1986): Protoplasmatische und fibrilläre Astrozyten.

Astrozyten zeigen eine große Heterogenität hinsichtlich ihrer Entwicklung, ihrer Morphologie und ihrer Genexpression (Bayraktar et al., 2014; Chaboub & Deneen, 2012) und unterscheiden sich in ihren physiologischen Eigenschaften und ihrer Reaktion auf pathologische Ereignisse (Farmer & Murai, 2017; Haim & Rowitch, 2017).

Es konnte gezeigt werden, dass kortikale und hippokampale Astrozyten stärker verzweigte Fortsätze und ein größeres Territorium besitzen als Astrozyten aus subkortikalen Regionen (Bushong et al., 2002; Morel, Higashimori, Tolman, & Yang, 2014). Weiterhin wurde beobachtet, dass die astrozytäre Expression der Glutamattransporter GLAST und GLT1 abhängig von der ZNS-Region variiert (Danbolt, 2001; Kerkerian, Nieoullon, & Dusticier, 1982; Regan et al., 2007).

In einer weiteren Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Astrozytenkulturen aus dem Mittelhirn und dem Kortex ein regionsspezifisches basales Profil der Zytokinexpression und eine regionsspezifische Regulation der Zytokinexpression nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) aufweisen (Kipp et al., 2008).

Jüngste Studien wiesen nach, dass sich Astrozyten nicht nur zwischen den einzelnen Hirnregionen unterscheiden, sondern auch innerhalb einer Hirnregion. So konnte im Kortex von Mäusen eine schichtspezifische molekulare und morphologische Diversität der Astrozyten beobachtet werden (Lanjakornsiripan et al., 2018).

Astrozyten spielen eine wichtige Rolle in fast allen Bereichen des ZNS von der Modulation der Synapsen bis hin zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels. Um den komplexen Bedürfnissen des ZNS gerecht zu werden, liegt die Vermutung nahe, dass Astrozyten eine heterogene Zellpopulation darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es Ähnlichkeiten und Unterschiede hinsichtlich Astrozytenzahlen und ihrer Morphologie während der Toxin-induzierten Demyelinisierung aufzudecken.

Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen wurde die Expression von fünf verschiedenen Antikörpern GFAP, ADLH1L1, BLBP, S100 β und Vimentin im Cuprizone-Tiermodell untersucht und die Ergebnisse mit den Werten der Kontrollgruppe verglichen.

GFAP wurde erstmals 1969 in Plaques von MS Patienten nachgewiesen (Eng et al., 1971) und wird von Astrozyten als auch von enterischen Gliazellen, Schwann-Zellen, Lymphozyten, myoepithelialen Zellen, Lebersternzellen, Chondrozyten und Fibroblasten exprimiert

(Bianchini et al., 1992; Carotti et al., 2008; Hainfellner et al., 2001; Kato et al., 1990; Riol et al., 1997; Viale et al., 1991).

Die Funktion von GFAP in Astrozyten als stabilisierendes Intermediärfilament ist bereits lange bekannt (Liedtke et al., 1996). Neuere Forschungsergebnisse zeigten, dass GFAP viele weitere Funktionen ausübt. GFAP spielt eine Rolle bei der Erhaltung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke sowie in der Koordination von Zellmigration, Zellproliferation und Zellkommunikation (Liedtke et al., 1996; Rutka & Smith, 1993; Weinstein et al., 1991).

Das 49 kDA schwere Protein GFAP gehört zur Gruppe der Typ III Intermediärfilamente (Deka et al., 2015). Bislang sind neben der am häufigsten vorkommenden Variante des humanen GFAP Protein GFAP α neun weitere Varianten beschrieben worden, welche durch alternatives Spleißen entstehen (Blechingberg et al., 2007; Hol et al., 2003; Nielsen et al., 2002; Roelofs et al., 2005; Zelenika et al., 1995). Es wird angenommen, dass die Multifunktionalität des Proteins auf die Expression verschiedener GFAP-Varianten zurückzuführen ist (Middeldorp & Hol, 2011).

Neben den beschriebenen physiologischen Funktionen ist GFAP auch an einer Vielzahl von pathologischen Prozessen beteiligt.

Studien konnten 2001 erstmals Mutationen des GFAP-Gen nachweisen, die zur Alexander-Krankheit führen und damit das erste Beispiel einer primär genetischen astrozytären Störung darstellt. Die Alexander-Krankheit stellt eine schwere neurologische Erkrankung dar, die als pathologisches Korrelat Rosenthal-Fasern aufweist, die sowohl GFAP als auch Hitzeschockproteine enthalten (Brenner et al., 2001).

Jüngste Untersuchungen konnten 2016 eine neue Autoimmunerkrankung nachweisen, die sich durch das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen das GFAP-Protein manifestiert. Die als Autoimmune GFAP Astrozytopathie bezeichnete Erkrankung führt zu einer ausgeprägten Meningoenzephalomyelitis (Kimura et al., 2019).

Der Anstieg oder Abfall der GFAP-Expression spiegelt Veränderungen der Astrozytenaktivität wider, die mit verschiedenen pathologischen Prozessen des ZNS einhergehen (Eng et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme der GFAP-Expression mit Depressionen korreliert (Johnston-Wilson et al., 2000), wohingegen eine Zunahme im Zusammenhang mit Autismus entdeckt wurde (Laurence & Fatemi, 2005). Des Weiteren zeigten Studien eine Korrelation zwischen erhöhten GFAP-Spiegeln im Liquor und akuten Verletzungen des ZNS wie Traumata oder Hirninfarkte (Aurell et al., 1991; Hausmann, Riess, Fieguth, & Betz, 2000). Studien im Bereich der Tumorforschung gaben Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer verminderten GFAP-Expression und dem Wachstum von Gliomen (Rutka et al., 1997). Zudem hat sich das Serum-GFAP als nützlicher diagnostischer Marker für das Glioblastoma multiforme erwiesen (Jung et al., 2007).

Die Rolle von GFAP im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankung wurde durch zahlreiche Studien untersucht. Eine Veränderung der GFAP-Expression konnte beispielsweise bei Morbus Alzheimer, der Amyotrophen Lateralsklerose, Morbus Huntington, Morbus Parkinson, Morbus Pick und MS nachgewiesen werden (Eng et al., 2000).

Studien zur MS zeigten, dass GFAP sowohl mit der Schwere und dem Fortschreiten der Krankheit als auch mit dem Ausmaß der Neuroinflammation korreliert (Axelsson et al., 2011; Kassubek et al., 2017; Petzold et al., 2002).

Astrozyten reagieren auf pathologische Prozesse im ZNS auf eine typische Art und Weise, die als Astrogliose bezeichnet wird und durch einen Anstieg der GFAP-Expression gekennzeichnet ist. Dies macht GFAP grundsätzlich zu einem guten Marker für Astrozyten. Jedoch zeigten Untersuchungen der letzten Jahre, dass immunhistochemische Färbungen mit GFAP nicht die Gesamtheit der Astrozytenmorphologie mit ihren fein verzweigten Fortsätzen darstellen (Bushong et al., 2002; Walz & Lang, 1998). Trotz dieser Einschränkungen ist GFAP bis heute der am häufigsten verwendete Astrozytenmarker.

Studien am Cuprizone-Modell konnten bisher zeigen, dass es nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung zu einer erhöhten astrozytären GFAP-Expression und zu einer Hypertrophie der Astrozyten im *Corpus callosum* und im Kortex kommt (Buschmann et al., 2012; Gudi et al., 2011; Hibbits, Yoshino, Le, & Armstrong, 2012; Schmidt et al., 2013). Diese Ergebnisse konnten wir durch unsere Untersuchungen bestätigen. Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation kam es zu einer erhöhten GFAP-Expression im Bereich des *Corpus callosum* und des primär somatosensorischen Kortex. Weiterhin zeigten die Astrozyten einen aktivierten Phänotyp mit vergrößertem GFAP⁻ Zellkörper und verlängerten, sowie stärker verzweigten, GFAP⁺ Zellfortsätzen.

Im Bereich des *Gyrus dentatus* konnten keine Veränderung der Astrozytenmorphologie und der Dichte GFAP⁺ Astrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Beobachtungen stehen kontrovers zu einer früheren Studie, die nach Cuprizone-Induktion eine Hyperplasie und Hypertrophie GFAP⁺, hippokampaler Astrozyten nachweisen konnte. Nach Cuprizone-Induktion fand im Hippocampus eine Demyelinisierung mit Mikrogliaaktivierung und Astrozytenaktivierung statt. (Norkute et al., 2009). In den durchgeführten Beobachtungen kam es bereits unter Kontrollbedingungen zur einer hohen astrozytäre GFAP-Expression. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass es zwar zu einer Astrozytenaktivierung kam, sich diese allerdings nicht in der Bestimmung der Zelldichte widerspiegelt.

Das Protein ADLH1L1 gehört zu der Familie der Aldehyd-Dehydrogenasen und wurde 1968 erstmals in Leberzellen beschrieben (Kutzbach & Stokstad, 1971). Während der Embryogenese wird ADLH1L1 von radialen Gliazellen exprimiert (Y. Yang et al., 2011), im

reifen ZNS konnte eine ADLH1L1-Expression vor allem in Astrozyten beobachtet werden (Neymeyer et al., 1997).

ADLH1L1 katalysiert die Reaktion von 10-FTHF zu THF und CO₂ und ist an der de-novo-Biosynthese und Regeneration von Methionin beteiligt. Somit übt ADLH1L1 einen maßgeblichen Einfluss auf die Zellteilung und -proliferation aus (Krupenko, 2009).

Der Effekt von ADLH1L1 auf die Zellteilung und -proliferation konnte in Studien im Bereich der Tumorforschung bestätigt werden. Eine Überexpression des Proteins führte zur Hemmung der Proliferation und zur Apoptose von Tumorzellen (Oleinik & Krupenko, 2003). Weiterhin konnte eine stark verminderte ADLH1L1-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien beobachtet werden (Krupenko & Oleinik, 2002).

Auch während der frühen ZNS-Entwicklung scheint ADLH1L1 eine wichtige Rolle zu spielen. So zeigten Studien einen Zusammenhang zwischen ADLH1L1 und dem Auftreten von Neuralrohrdefekten (Anthony & Heintz, 2007).

ADLH1L1 wurde 2008 erstmals als Astrozytenmarker eingesetzt. Studien an Mäusen und Ratten konnten zeigen, dass mithilfe der anti-ADLH1L1 Immunhistochemie Astrozyten einschließlich ihrer stark verzweigten Fortsätze markiert werden können. Im Gegensatz dazu zeigten sich mithilfe der anti-GFAP Immunhistochemie nur die Primärfortsätze der Astrozyten (Cahoy et al., 2008).

Wir konnten mit unseren Beobachtungen bestätigen, dass ADLH1L1⁺ Astrozyten in den Kontrolltieren viele verzweigte, ADLH1L1⁺ Zellfortsätze aufwiesen, der Zellkörper hingegen stellte sich als ADLH1L1⁻ dar (Typ 1). Zusätzlich konnten wir einen zweiten Zelltyp identifizieren, der nur einen ADLH1L1⁺ Zellkörper besaß, ohne dass Zellfortsätze ersichtlich wurden (Typ 2). Somit ist anzunehmen, dass es zwei unterschiedliche ADLH1L1⁺ Astrozytenpopulationen gibt. Astrozyten vom Typ 1 transportieren das Protein ADLH1L1 nach der Herstellung in die Zellfortsätze, wohingegen es bei Astrozyten vom Typ 2 im Zellkern oder im perinukleären Plasma verbleibt.

Nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation zeigten sich im *Corpus callosum* und im primär somatosensorischen Kortex hyperplastische und hypertrophe Astrozyten mit stark vergrößertem ADLH1L1⁻ Zellkörper und verlängerten ADLH1L1⁺ Fortsätzen. Astrozyten vom Typ 2 waren nicht nachweisbar. In den oberflächlichen Schichten des primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* konnte mithilfe der anti-ADLH1L1 Immunhistochemie keine Astrozytenaktivierung nachgewiesen werden. Die Dichte ADLH1L1⁺ Astrozyten nahm im *Corpus callosum* stark zu, im primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* hingegen konnte nur ein leichter Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Erkenntnisse bestärken die Annahme, dass aktivierte Astrozyten im Cuprizone-Modell in Bereichen starker Demyelinisierung und deren umgebenden Hirnregionen, verstärkt ADLH1L1 exprimieren.

Grundsätzlich decken sich unsere Beobachtungen mit den Studien, die sich bislang mit der Expression von ADLH1L1 in aktivierten Astrozyten beschäftigt haben. Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen akuter Gehirnverletzungen sowie bei neurodegenerativen Zuständen zu einem Anstieg der ADLH1L1-Expression kommt (Y. Yang et al., 2011). Weiterhin konnte ein Anstieg der ADLH1L1-Expression nach Lysolecithin-vermittelter Demyelinisierung beobachtet werden (Yoon et al., 2017).

Erste Studien an Ratten und Mäusen zur Kollokalisierung von ADLH1L1 und GFAP in Astrozyten konnten zeigen, dass alle GFAP⁺ Zellen gleichzeitig ADLH1L1⁺ sind, wohingegen nicht alle ADLH1L1⁺ Zellen gleichzeitig GFAP⁺ waren (Cahoy et al., 2008).

In unseren Untersuchungen zur Kollokalisierung von ADLH1L1 und GFAP konnten wir beobachten, dass sich nach 5-wöchiger Cuprizone-Induktion im *Corpus callosum* und im *Gyrus dentatus* die meisten Astrozyten doppel-positiv für beide Antikörper darstellten. Im primär somatosensorischen Kortex hingegen fanden sich neben vielen ADLH1L1⁺/GFAP⁻ nur wenige doppelt-positive Astrozyten. Letztere Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass es im primär somatosensorischen Kortex zwei Astrozytenpopulationen gibt: ADLH1L1⁺ Astrozyten, welche GFAP exprimieren und ADLH1L1⁺ Astrozyten welche kein GFAP exprimieren.

Vimentin ist an zahlreichen physiologischen Funktionen wie der Zelldifferenzierung, -proliferation, -migration, -adhesion und -invasion aktiv beteiligt (Boraas & Ahsan, 2016; Eckes et al., 2000; Nieminen et al., 2006; Richardson et al., 2018).

Das 57 kDA schwere Protein wird von allen mesenchymalen Zellen, darunter auch Astrozyten (Sharp, Osborn, & Weber, 1982), exprimiert.

Auch in der Pathogenese vieler Erkrankungen spielt Vimentin eine wichtige Rolle. Beobachtungen im Bereich der Arthritis-Forschung beschäftigten sich mit der Verwendung von Vimentin als diagnostischer Marker. Erste Ergebnisse deuteten darauf hin, dass mutiertes citrunilliertes Vimentin ein geeigneter Marker für die Diagnose der Rheumatoiden Arthritis und für das Monitoring einer Therapie mit Infliximab ist (Nicaise Roland et al., 2008).

Viele Studien zur Tumorforschung konnten bisher Hinweise auf eine Beteiligung von Vimentin an der Pathogenese von Tumorerkrankungen geben. Beispielsweise zeigte sich eine erhöhte Koexpression von Vimentin und Keratin in Melanomzellen, die zu einer erhöhten Zellmigration führte (Chu et al., 1996). Untersuchungen zum Lungen- und Mammakarzinom zeigten, dass Vimentin an Prozessen der Tumorentstehung und der Metastasierung aktiv beteiligt ist (Kidd et al., 2014; Kokkinos et al., 2007).

Die Rolle von Vimentin als Astrozytenmarker wurde bereits im Rahmen mehrerer Studien untersucht (Potokar, Morita, Wiche, & Jorgačevski, 2020). Eine post-mortem Untersuchung des Hirngewebes von MS-Patienten zeigte im Bereich der MS-Läsionen zahlreiche Vimentin⁺ Astrozyten vom protoplasmatischen und fibrillären Typ (Yamada et al., 1992).

In unseren Beobachtungen konnten wir unter Kontrollbedingungen eine hohe Dichte Vimentin⁺ Astrozyten nachweisen. Sie zeichneten sich durch stark verzweigte Vimentin⁺ Zellfortsätze und durch einen Vimentin⁻ Zellkörper aus. Vimentin wird vor zahlreichen mesenchymalen Zellpopulationen exprimiert und ist somit nicht spezifisch für Astrozyten (Sharp et al., 1982). Dennoch ließ sich die Astrozytenmorphologie einschließlich der stark verzweigten Fortsätze sehr gut visualisieren, sodass Astrozyten aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung gut von anderen Vimentin⁺ Strukturen abgegrenzt werden konnten.

Auch die Vimentin-Expression wurde bereits als Indikator für aktivierte Astrozyten untersucht (Fuller et al., 2007; Nash, Ioannidou, & Barnett, 2011). Beobachtungen der letzten Jahre zeigten, dass es nach Schädigung des Gehirns durch Schlaganfall oder Trauma zu einer erhöhten astrozytären Vimentin-Expression kommt.

Auch im Kontext der MS konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. So wurden in post-mortem Gewebeschnitten von MS-Patienten aktivierte Astrozyten nachgewiesen, welche vermehrt Vimentin exprimierten (Yamada et al., 1992). Darüber hinaus zeigten immunhistochemische Studien an Mäusen, dass es nach Cuprizone-Intoxikation zu einem Anstieg der astrozytären Vimentin-Expression kommt. Der Anstieg zeigte sich am stärksten im *Corpus callosum* und weniger ausgeprägt im angrenzenden *Kortex* (Hibbits et al., 2012)

Ganz ähnliche Befunde ergaben sich in unseren Untersuchungen nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation. Im gesamten *Corpus callosum* kam es zu einem deutlichen Anstieg der Dichte Vimentin⁺ Astrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem konnte auch in den tiefen Schichten des primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* eine deutlich erhöhte Dichte Vimentin⁺ Zellen festgestellt werden, wohingegen in den oberflächlichen kortikalen Schichten keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar wurde.

Auch auf morphologischer Ebene konnte die Astrozytenaktivierung durch die anti-Vimentin-Immunhistochemie visualisiert werden. Astrozyten des *Corpus callosum* und des *Gyrus dentatus* zeigten einen aktivierten Phänotyp mit stark geschwollenem Zellkörper und verlängerten, verzweigten Zellfortsätzen. Im Bereich des primär somatosensorischen Kortex war hingegen keine augenscheinliche Veränderung der Astrozytenmorphologie ersichtlich.

Das Protein BLBP gehört zur Familie der fettsäurebindenden Proteine und wird hauptsächlich von Astrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert (Owada et al., 1996; Sharifi et al., 2013).

Das 14 - 15 kDA schwere Protein wurde erstmals 1994 in murinen Neuroepithelzellen nachgewiesen und besteht aus zehn antiparallelen Beta-Faltblättern, die von zwei Alpha-Helices überlagert werden.

BLBP beteiligt sich an der Modulation der intrazellulären Verteilung der Fettsäuren und könnte somit einen Einfluss auf Signaltransduktion und genregulatorische Aktivitäten ausüben (Kipp, Clarner, et al., 2011; Owada et al., 1996).

BLBP scheint zudem an einer Vielzahl pathologischer Mechanismen im ZNS aktiv beteiligt zu sein.

Mehrere Studien konnten eine Assoziation von BLBP mit einer schlechten Prognose des malignen Glioms nachweisen (Godbout, Bisgrove, Shkolny, & Day, 1998; Kagawa et al., 2019; Kaloshi et al., 2007; Liang et al., 2005; Tso et al., 2006). Zudem konnte eine Einflussnahme von BLBP auf die Zellmorphologie von malignem Gliomen beobachtet werden (Mita et al., 2007).

In einer weiteren Studie konnte eine erhöhte BLBP Expression in Astrozyten nach Gehirnverletzung (Sharifi et al., 2011) nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass Docosahexaensäure (DHA), ein Ligand von BLBP, Neuronen und Astrozyten nach Hirnischämie und Rückenmarksverletzungen vor Zelldegeneration schützt, was auf eine Rolle von BLBP bei der Regulierung von ZNS-Schäden hindeutet (Belayev et al., 2011).

Auch im Kontext von MS-Tiermodellen wurde die Rolle von BLBP bereits untersucht. Zwei verschiedene BLBP⁺ Zelltypen zeigten sich in einer Beobachtung am Cuprizone-Modell: BLBP⁺/GAFF⁺ Zellen mit vielen Zellfortsätzen und rundliche BLBP⁺/GFAP⁻ Zellen ohne Zellfortsätze (Kipp, Clarner, et al., 2011).

In unseren Beobachtungen konnte das Vorkommen von zwei unterschiedlichen BLBP⁺ Astrozytenpopulationen bestätigt werden. Astrozyten vom Typ 1 zeigten einen BLBP⁺ Zellkörper und kurze BLBP⁺ Zellfortsätze, wohingegen Astrozyten vom Typ 2 einen BLBP⁺ Zellkörper ohne Zellfortsätze aufwiesen.

Mehrere Studien beschäftigten sich bisher mit dem Zusammenhang zwischen Astrozytenaktivierung und BLBP-Expression in MS-Tiermodellen. Beobachtungen am Modell der MOG-induzierten EAE an Mäusen zeigten, dass es zur Akkumulation BLBP⁺/GFAP⁺ Zellen im Rückenmark von Mäusen kam. Drei Wochen später konnten hypertrophe BLBP⁺ Astrozyten am Rande der Läsionen beobachtet werden (Bannerman et al., 2007).

Studien am EAE-Modell zeigten einen Anstieg der BLBP-Expression in Astrozyten in der Frühphase der EAE (Kamizato et al., 2019).

Weitere Beobachtungen legten nahe, dass die BLBP-Expression in aktivierten Astrozyten eine positive Korrelation mit dem Remyelinisierungsversagen sowie eine negative Korrelation mit der Krankheitsdauer aufweist (Kipp, Gingele, et al., 2011).

Ähnliche Ergebnisse konnten wir bei unseren Untersuchungen nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation erheben. Es kam zu einer Aktivierung BLBP⁺ Astrozyten, welche stark vergrößerte BLBP⁺ Zellkörper und verlängerte BLBP⁺ Fortsätze aufwiesen. Die Aktivierung zeigte sich

insbesondere im *Corpus callosum* und in den tiefen Schichten des primär somatosensorischen Kortex, wo es zu einer starken Zunahme der Dichte BLBP⁺ Astrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. In den oberflächlichen Schichten des primär somatosensorischen Kortex und im *Gyrus dentatus* hingegen fiel die Zunahme geringer aus. Das Ausmaß der Aktivierung BLBP⁺ Astrozyten deckte sich somit mit dem Ausmaß der Demyelinisierung des Cuprizone-Tiermodells.

S100 β gehört zur Familie der calciumbindenden S100-Proteine und wird im ZNS vor allem von Astrozyten, weiteren Gliazellen und bestimmten Neuronensubpopulationen exprimiert (Didier et al., 1986; Ferri et al., 1982; Ludwin et al., 1976; Marenholz et al., 2004; Rickmann & Wolff, 1995). Das 21 kDA schwere Protein wurde 1977 erstmals aus bovinen Gehirnzellen isoliert (Isobe et al., 1977). Es besitzt vier Bindestellen für Calcium, wobei die Bindungsaffinität für Calcium durch die Bindung von Kupfer und Zink an das Protein reguliert wird (Heizmann & Cox, 1998; Isobe et al., 1978). Eine Vielzahl intrazellulärer Mechanismen wie die Zellproliferation und -differenzierung (Arcuri et al., 2005; Baudier et al., 1992; Millward et al., 1998), die Calcium-Homöostase (Gentil et al., 2001; Pozdnyakov et al., 1997), verschiedene Enzymaktivitäten (Brozzi et al., 2009; Tsoporis et al., 2009; Zimmer & Van Eldik, 1986) und der Aufbau und Erhalt des Zytoskeletts (Baudier & Cole, 1988; Donato, 1988; Mbele et al., 2002) werden durch S100 β reguliert. Sowohl der Liquor- als auch der S100 β -Spiegel im Blut werden als verlässliche Biomarker für akute Hirnverletzungen angesehen (Chong, 2016; de Azúa López et al., 2015; Thelin et al., 2017). Im Rahmen des Malignen Melanoms wird S100 β zudem als Marker für Diagnose und Prognose verwendet (Brouard et al., 2000; Loppin et al., 2007).

S100 β wurde auch im Zusammenhang mit der MS von mehreren Studien untersucht. Ende der 1970er Jahre wurden erstmals erhöhte extrazelluläre S100 β -Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen (Michetti et al., 1979), in späteren Beobachtungen zeigte sich zudem eine Korrelation mit der Schwere der Erkrankung (Michetti et al., 2012).

Die Rolle von S100 β als Astrozytenmarker ist bislang noch nicht abschließend geklärt worden. In zwei Studien wurde gezeigt, dass S100 β in oligodendroglialen Vorläuferzellen exprimiert wird, welche sich später zu reifen Oligodendrozyten differenzieren. (Deloulme et al., 2004; Hachem et al., 2005). Somit ist davon auszugehen, dass die S100 β -Expression nicht auf die astrozytäre Zelllinie im ZNS beschränkt ist.

Eine weiterführende Studie verglich die Expression des bekannten Astrozytenmarkers GFAP mit der von S100 β und beobachtete das Vorkommen von sowohl S100 β ⁺/GFAP⁻ als auch von S100 β ⁻/GFAP⁺ Astrozyten (Wang & Bordey, 2008).

Wir konnten zeigen, dass in allen von uns analysierten Hirnregionen mäßig S100β⁺ Zellen vorkamen. Die Zellen zeigten einen S100β⁺ Zellkörper als auch S100β⁺ Fortsätze ohne weitere Verzweigungen.

Neben dem oben beschriebenen Zelltyp konnten wir einen weiteren, stark S100β⁺ Zelltyp ohne Zellfortsätze im *Cingulum* und *Fornix* beobachten. In einer noch nicht veröffentlichten Studie unserer Arbeitsgruppe konnte eine Koexpression von Olig2 beobachtet werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den stark S100β⁺/Olig2⁺ Zellen um Zellen der Oligodendrozytenzelllinie handelt.

Untersuchung am EAE-Modell konnten bisher zeigen, dass es zu einem Anstieg der S100β-Expression im frühen Stadium und im Verlauf der Erkrankung kommt (Grygorowicz, Welniak-Kamińska, & Strużyńska, 2016).

Weiterführende Studien konnten unter Verwendung eines *ex vivo*-Demyelinisierungsmodells mit Lysophosphatidylcholin eine erhöhte astrozytäre S100β-Expression in der Phase der Demyelinisierung zeigen (Barateiro et al., 2016). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass es einen Zusammenhang zwischen der Astrozytenaktivierung und einer veränderten S100β-Expression gibt. Wir konnten diesen Zusammenhang im Cuprizone-Modell nicht bestätigen. Nach 5-wöchiger Cuprizone-Induktion konnte weder eine Veränderung der Morphologie S100β⁺ Astrozyten beobachtet werden, noch kam es zu einem deutlichen Anstieg der astrozytären S100β-Expression. In unseren Untersuchungen stellte sich die anti-S100β Immunhistochemie als Verfahren für den Nachweis aktivierter Astrozyten nach Cuprizone-Intoxikation als ungeeignet dar.

Zusammenfassend konnten wir im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass Astrozyten eine heterogene Zellpopulation darstellen. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation visualisierten die verwendeten Antikörper unterschiedliche Aspekte dieser Heterogenität. In der weißen Substanz kam es zu einer ausgeprägten Astrozytenaktivierung als in der grauen Substanz. Auf morphologischer Ebene zeigten die Astrozyten je nach verwendetem Antikörper unterschiedliche Phänotypen. Darüber hinaus zeigten unsere Ergebnisse, dass verschiedene Antikörper die Astrozytenaktivierung im Cuprizone-Modell unterschiedlich gut visualisieren (Tabelle 23). Mithilfe der anti-S100β Immunhistochemie konnte in keiner der analysierten Hirnregionen eine Astrozytenaktivierung dargestellt werden.

Tabelle 233: Vergleich der Astrozytenmarker im Cuprizone Modell

Region	Bester Astrozytenmarker
Mediales Corpus callosum	BLBP
Laterales Corpus callosum	ALDH1L1

	GFAP
Archikortex	Vimentin
Neokortex	GFAP

Wichtige Fragen zur Astrozytenheterogenität müssen jedoch im Rahmen von weiterführenden Studien geklärt werden. Die Verwendung mehrerer Antikörper, die gegen verschiedene Epitope von Astrozyten gerichtet sind, könnte bei der Quantifizierung des Transkriptoms und der Visualisierung von Astrozyten helfen. Die ideale Antikörper-Kombination müsste hierbei für jede ZNS-Region und für jedes Tiermodell einzeln untersucht werden. Nur wenn wir es schaffen Astrozyten in ihrer Gesamtheit darzustellen, ist es uns möglich Rückschlüsse auf ihre Rolle in der Pathogenese der MS zu ziehen.

6. Zusammenfassung

Die MS ist eine erworbene, chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems. Sie äußert sich durch die Ausbildung entzündlicher Läsion in der weißen und grauen Substanz, welche abhängig von ihrer Lokalisation zu neurologischen Ausfällen führen.

Experimentelle Tiermodelle, wie das Cuprizone-Modell, stellen Teilaspekte des Pathomechanismus der MS dar und helfen so, ihn besser zu verstehen und Therapieansätze zu entwickeln.

Astrozyten gehören zur Gruppe der Makroglia im ZNS und erfüllen vielfältige Funktionen wie die Aufrechterhaltung der ZNS-Homöostase und die Regulierung von Neurodegeneration.

Im Kontext der MS reagieren Astrozyten mit einer Astrogliose, welche sich morphologisch durch Proliferation, Hypertrophie und Ausbildung einer Glianarbe äußert. Es wird angenommen, dass Astrozyten eine aktive Rolle während der Demyelinisierung und der Remyelinisierung spielen und den Krankheitsverlauf sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können.

Astrozyten zeigen eine große Heterogenität hinsichtlich ihrer Entwicklung, ihrer Morphologie und ihrer Genexpression.

Das Zytoskelettprotein GFAP gilt als der am weitesten verbreitete Marker für die Visualisierung von Astrozyten. Allerdings sind nicht alle Astrozyten GFAP⁺ und nicht alle GFAP⁺ Zellen sind Astrozyten, was zu einer Fehlinterpretation im Hinblick auf die Funktion von Astrozyten in physiologischen und pathologischen Prozessen führen kann.

Neben GFAP existieren weitere Astrozytenmarker, wie Antikörper gegen die zytoplasmatischen Marker ADLH1L1 und Vimentin sowie gegen die nukleozytoplasmatischen Marker BLBP und S100 β . Inwieweit diese Marker Astrozyten im ruhenden und aktivierten Zustand zuverlässig visualisieren ist bislang unzureichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es Ähnlichkeiten und Unterschiede hinsichtlich Astrozytenzahlen und Astrozytenmorphologie während der Toxin-induzierten Demyelinisierung aufzudecken.

Hierfür wurden Gewebeproben von Versuchstieren nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation immunhistochemisch aufbereitet und im Hinblick auf die Expression von GFAP, ADLH1L1, Vimentin, BLBP und S100 β untersucht.

Insgesamt konnten wir durch unsere Untersuchungen zeigen, dass Astrozyten eine stark heterogene Zellpopulation darstellen. Die verwendeten Antikörper visualisieren verschiedene Aspekte dieser komplexen Heterogenität.

Zukünftige Studien könnten verschiedene Antikörper-Kombinationen untersuchen, um so die Astrozyten in ihrer Gesamtheit darzustellen und Rückschlüsse auf ihre Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose zu ziehen.

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien - Tierstall.....	21
Tabelle 2: Materialien - Perfusion	21
Tabelle 3: Materialien - Paraffineinbettung	23
Tabelle 4: Materialien - Paraffinschneiden.....	24
Tabelle 5: Materialien - Histologische Gewebsaufbereitung.....	24
Tabelle 6: Primärantikörper	25
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	25
Tabelle 8: Geräte.....	26
Tabelle 9: Chemikalien für die transkardiale Perfusion	27
Tabelle 10: Paraffineinbettung	28
Tabelle 11: Lösungen der immunhistochemischen Färbung	31
Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper.....	32
Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper.....	32
Tabelle 14: Zuordnung von Primär- und Sekundärantikörpern.....	32
Tabelle 15: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbung	32
Tabelle 16: Untersuchte Hirnregionen	34
Tabelle 17: Lösungen der Immunfluoreszenzfärbung	37
Tabelle 18: Verwendete Primärantikörper.....	38
Tabelle 19: Verwendete fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper	38
Tabelle 20: Zuordnung von Primär- zu Sekundärantikörpern.....	38
Tabelle 21: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung.....	38
Tabelle 22: Untersuchte Hirnregionen	40
Tabelle 23: Vergleich der Astrozytenmarker im Cuprizone Modell.....	63

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.....	8
Abbildung 2: Strukturformel von Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon	9
Abbildung 3: Protoplasmatischer und fibrillärer Astrozyt (Vandyke Carter & Gray, 1918) ...	11
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung eines humanen GFAP-Gens mit möglichen Isotyp-Varianten (Middeldorp & Hol, 2011)	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines humanen GFAP-Proteins mit möglichen Isotyp-Varianten (Middeldorp & Hol, 2011)	14
Abbildung 6: Struktur des Vimentin-Proteins (Tang, 2008)	16
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des BLBP-Proteins (Ernst, 2009).....	18
Abbildung 8: Struktur des S100-Proteins (Heizmann, Fritz, & Schäfer, 2002).....	19
Abbildung 9: Region 275 in koronarer Ansicht (Sidman et al., 1971)	29
Abbildung 10: Schematische Darstellung der ABC-Methode	30
Abbildung 11: Darstellung der untersuchten Hirnregionen nach immunhistochemischer Färbung	35
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung	36
Abbildung 13: Darstellung der untersuchten Hirnregionen nach Immunfluoreszenzfärbung	40
Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von GFAP vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation	43
Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von ADLH1L1 vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation.....	45
Abbildung 16: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit ADLH1L1 und GFAP nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation	47
Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation.....	49
Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von BLBP vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation	51
Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von S100 β vergleichend bei Kontrolltieren und nach 5-wöchiger Cuprizone-Intoxikation.....	53

V. Eidesstattliche Versicherung

Fricke, Julia Gesine

Name, Vorname

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

„Astrozytenheterogenität in Multiple Sklerose Tiermodellen“

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

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

Basel, 17.03.2022

Ort, Datum

Julia Gesine Fricke

Unterschrift Doktorandin

VI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die diese Arbeit ermöglicht und ihre Vollendung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, für die herausragende Betreuung meiner Promotion. Während der gesamten Zeit stand er mir mit ausgezeichnetem fachlichem Rat zur Seite. Von der Themenstellung über die Durchführung und Auswertung der Versuche bis hin zur Korrektur meiner Arbeit konnte ich mich auf seine Hilfsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen verlassen. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Schmitz möchte ich für die Möglichkeit meine Promotion an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen, meinen Dank aussprechen.

Frau Dr. Tanja Hochstrasser danke ich ebenso für die hervorragende Mitbetreuung bei der Durchführung der Versuche.

Bedanken möchte ich mich zudem bei den technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München – insbesondere bei Frau Beate Aschauer, Frau Astrid Baltruschat und Frau Sabine Tost – für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern und bei meinem Freund möchte ich mich ganz besonders herzlich für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während meines Studiums bedanken, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

VII. Literaturverzeichnis

- Acs, P., Kipp, M., Norkute, A., Johann, S., Clarner, T., Braun, A., . . . Beyer, C. (2009). 17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia*, *57*(8), 807-814. doi:10.1002/glia.20806
- Adamo, A. M., Paez, P. M., Escobar Cabrera, O. E., Wolfson, M., Franco, P. G., Pasquini, J. M., & Soto, E. F. (2006). Remyelination after cuprizone-induced demyelination in the rat is stimulated by apotransferrin. *Exp Neurol*, *198*(2), 519-529. doi:10.1016/j.expneurol.2005.12.027
- Allore, R., O'Hanlon, D., Price, R., Neilson, K., Willard, H. F., Cox, D. R., . . . Dunn, R. J. (1988). Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science*, *239*(4845), 1311-1313. doi:10.1126/science.2964086
- Antfolk, D., Sjöqvist, M., Cheng, F., Isoniemi, K., Duran, C. L., Rivero-Muller, A., . . . Sahlgren, C. M. (2017). Selective regulation of Notch ligands during angiogenesis is mediated by vimentin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(23), E4574-e4581. doi:10.1073/pnas.1703057114
- Anthony, T. E., & Heintz, N. (2007). The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *Journal of Comparative Neurology*, *500*(2), 368-383. doi:10.1002/cne.21179
- Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., & Donato, R. (2005). S100B increases proliferation in PC12 neuronal cells and reduces their responsiveness to nerve growth factor via Akt activation. *J Biol Chem*, *280*(6), 4402-4414. doi:10.1074/jbc.M406440200
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*, *61*(4), 288-299. doi:10.1002/ana.21117
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2016). Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol*, *36*(2), 103-114. doi:10.1055/s-0036-1579693
- Aurell, A., Rosengren, L. E., Karlsson, B., Olsson, J. E., Zbornikova, V., & Haglid, K. G. (1991). Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke*, *22*(10), 1254-1258. doi:10.1161/01.str.22.10.1254
- Axelsson, M., Malmeström, C., Nilsson, S., Haghghi, S., Rosengren, L., & Lycke, J. (2011). Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol*, *258*(5), 882-888. doi:10.1007/s00415-010-5863-2
- Bakker, D. A., & Ludwin, S. K. (1987). Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J Neurol Sci*, *78*(2), 125-137. doi:10.1016/0022-510x(87)90055-4
- Bannerman, P., Hahn, A., Soulika, A., Gallo, V., & Pleasure, D. (2007). Astrogliosis in EAE spinal cord: Derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia. *Glia*, *55*(1), 57-64. doi:10.1002/glia.20437

- Barateiro, A., Afonso, V., Santos, G., Cerqueira, J. J., Brites, D., van Horsen, J., & Fernandes, A. (2016). S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*, 53(6), 3976-3991. doi:10.1007/s12035-015-9336-6
- Basoglu, H., Boylu, N. T., & Kose, H. (2013). Cuprizone-induced demyelination in Wistar rats; electrophysiological and histological assessment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17(20), 2711-2717.
- Baudier, J., & Cole, R. D. (1988). Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 263(12), 5876-5883.
- Baudier, J., Delphin, C., Grunwald, D., Khochbin, S., & Lawrence, J. J. (1992). Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(23), 11627-11631. doi:10.1073/pnas.89.23.11627
- Bayraktar, O. A., Fuentealba, L. C., Alvarez-Buylla, A., & Rowitch, D. H. (2014). Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), a020362. doi:10.1101/cshperspect.a020362
- Beaudeau, J., Dequen, L., & Foglietti, M. (1999). [Pathophysiologic aspects of S-100beta protein: a new biological marker of brain pathology]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 57(3), 261-272.
- Belayev, L., Khoutorova, L., Atkins, K. D., Eady, T. N., Hong, S., Lu, Y., . . . Bazan, N. G. (2011). Docosahexaenoic Acid therapy of experimental ischemic stroke. *Transl Stroke Res*, 2(1), 33-41. doi:10.1007/s12975-010-0046-0
- Bianchini, D., De Martini, I., Cadoni, A., Zicca, A., Tabaton, M., Schenone, A., . . . Mancardi, G. L. (1992). GFAP expression of human Schwann cells in tissue culture. *Brain Res*, 570(1-2), 209-217. doi:10.1016/0006-8993(92)90583-u
- Blakemore, W. F. (1972). Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol*, 1(4), 413-426. doi:10.1007/bf01102943
- Blakemore, W. F. (1973). Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci*, 20(1), 73-83. doi:10.1016/0022-510x(73)90119-6
- Blechingberg, J., Holm, I. E., Nielsen, K. B., Jensen, T. H., Jørgensen, A. L., & Nielsen, A. L. (2007). Identification and characterization of GFAPkappa, a novel glial fibrillary acidic protein isoform. *Glia*, 55(5), 497-507. doi:10.1002/glia.20475
- Bongcam-Rudloff, E., Nistér, M., Betsholtz, C., Wang, J. L., Stenman, G., Huebner, K., . . . Westermarck, B. (1991). Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer Res*, 51(5), 1553-1560.
- Boraas, L. C., & Ahsan, T. (2016). Lack of vimentin impairs endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Sci Rep*, 6, 30814. doi:10.1038/srep30814

- Brenner, M., Johnson, A. B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J. E., & Messing, A. (2001). Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet*, 27(1), 117-120. doi:10.1038/83679
- Brosnan, C. F., & Raine, C. S. (2013). The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*, 61(4), 453-465. doi:10.1002/glia.22443
- Brouard, M., Quillien, V., Ollivier, I., Lesimple, T., Adamski, H., & Chevrant-Breton, J. (2000). [Serum S100B protein and stage of cutaneous melanoma: a prospective study]. *Ann Dermatol Venereol*, 127(1), 56-59.
- Brozzi, F., Arcuri, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2009). S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *J Biol Chem*, 284(13), 8797-8811. doi:10.1074/jbc.M805897200
- Buschmann, J. P., Berger, K., Awad, H., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2012). Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *J Mol Neurosci*, 48(1), 66-76. doi:10.1007/s12031-012-9773-x
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, 22(1), 183-192. doi:10.1523/jneurosci.22-01-00183.2002
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., . . . Barres, B. A. (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *The Journal of Neuroscience*, 28(1), 264-278. doi:10.1523/jneurosci.4178-07.2008
- Cannella, B., & Raine, C. S. (1995). The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 37(4), 424-435. doi:10.1002/ana.410370404
- Carlton, W. W. (1966). Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol*, 8(3), 512-521. doi:10.1016/0041-008x(66)90062-7
- Carlton, W. W. (1967). Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci*, 6(1), 11-19. doi:10.1016/0024-3205(67)90356-6
- Carlton, W. W. (1969). Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone. *Exp Mol Pathol*, 10(3), 274-287. doi:10.1016/0014-4800(69)90057-4
- Carotti, S., Morini, S., Corradini, S. G., Burza, M. A., Molinaro, A., Carpino, G., . . . Gaudio, E. (2008). Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent hepatitis C. *Liver Transpl*, 14(6), 806-814. doi:10.1002/lt.21436
- Chaboub, L. S., & Deneen, B. (2012). Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Dev Neurosci*, 34(5), 379-388. doi:10.1159/000343723

- Chang, L., Shav-Tal, Y., Trcek, T., Singer, R. H., & Goldman, R. D. (2006). Assembling an intermediate filament network by dynamic cotranslation. *J Cell Biol*, *172*(5), 747-758. doi:10.1083/jcb.200511033
- Cheng, F., Shen, Y., Mohanasundaram, P., Lindström, M., Ivaska, J., Ny, T., & Eriksson, J. E. (2016). Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(30), E4320-4327. doi:10.1073/pnas.1519197113
- Chong, Z. Z. (2016). S100B raises the alert in subarachnoid hemorrhage. *Rev Neurosci*, *27*(7), 745-759. doi:10.1515/revneuro-2016-0021
- Chu, Y. W., Seftor, E. A., Romer, L. H., & Hendrix, M. J. (1996). Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *Am J Pathol*, *148*(1), 63-69.
- Cocchia, D., Michetti, F., & Donato, R. (1981). Immunochemical and immuno-cytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature*, *294*(5836), 85-87. doi:10.1038/294085a0
- Colucci-Guyon, E., Giménez, Y. R. M., Maurice, T., Babinet, C., & Privat, A. (1999). Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia*, *25*(1), 33-43.
- Cook, R. J., Lloyd, R. S., & Wagner, C. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones for rat liver 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J Biol Chem*, *266*(8), 4965-4973.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, *65*(1), 1-105. doi:10.1016/s0301-0082(00)00067-8
- Dave, J. M., & Bayless, K. J. (2014). Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation*, *21*(4), 333-344. doi:10.1111/micc.12111
- de Azúa López, Z. R., Egea-Guerrero, J. J., Rivera-Rubiales, G., Rodríguez-Rodríguez, A., Vilches-Arenas, Á., & Murillo-Cabezas, F. (2015). Serum brain injury biomarkers as predictors of mortality after severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: preliminary results. *Clin Chem Lab Med*, *53*(8), e179-181. doi:10.1515/cclm-2014-1189
- de Gruyter, W. (1986). *Pschyremble: Klinisches Wörterbuch*. Berlin.
- Deka, H., Sarmah, R., Sharma, A., & Biswas, S. (2015). Modelling and Characterization of Glial Fibrillary Acidic Protein. *Bioinformation*, *11*(8), 393-400. doi:10.6026/97320630011393
- Deloulme, J. C., Raponi, E., Gentil, B. J., Bertacchi, N., Marks, A., Labourdette, G., & Baudier, J. (2004). Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci*, *27*(4), 453-465. doi:10.1016/j.mcn.2004.07.008
- Didier, M., Harandi, M., Aguera, M., Bancel, B., Tardy, M., Fages, C., . . . Belin, M. F. (1986). Differential immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic (GFA) protein, S-100 protein and glutamine synthetase in the rat subcommissural organ, nonspecialized

- ventricular ependyma and adjacent neuropil. *Cell Tissue Res*, 245(2), 343-351. doi:10.1007/bf00213941
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*, 26(1), 27-40. doi:10.1111/ene.13819
- Donato, R. (1988). Calcium-independent, pH-regulated effects of S-100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubule protein in vitro. *J Biol Chem*, 263(1), 106-110.
- Donato, R. (1991). Perspectives in S-100 protein biology. Review article. *Cell Calcium*, 12(10), 713-726. doi:10.1016/0143-4160(91)90040-1
- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T., & Martin, P. (2000). Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci*, 113 (Pt 13), 2455-2462.
- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., . . . Krieg, T. (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci*, 111 (Pt 13), 1897-1907.
- Elobeid, A., Bongcam-Rudloff, E., Westermark, B., & Nistér, M. (2000). Effects of inducible glial fibrillary acidic protein on glioma cell motility and proliferation. *J Neurosci Res*, 60(2), 245-256. doi:10.1002/(sici)1097-4547(20000415)60:2<245::Aid-jnr14>3.0.Co;2-1
- Elsworth, S., & Howell, J. M. (1973). Variation in the response of mice to cuprizone. *Res Vet Sci*, 14(3), 385-387.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 25(9-10), 1439-1451. doi:10.1023/a:1007677003387
- Eng, L. F., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A., & Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28(2), 351-354. doi:10.1016/0006-8993(71)90668-8
- Ernst, M. W. (2009). Structure of the FABP7 protein. Retrieved from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_FABP7_PDB_1fdq.png
- Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*, 28(3), 138-145. doi:10.1016/j.it.2007.01.005
- Farmer, W. T., & Murai, K. (2017). Resolving Astrocyte Heterogeneity in the CNS. *Front Cell Neurosci*, 11, 300. doi:10.3389/fncel.2017.00300
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24(9), 2143-2155. doi:10.1523/jneurosci.3547-03.2004
- Fernández-Ortega, C., Ramírez, A., Casillas, D., Paneque, T., Ubieta, R., Dubed, M., . . . Betancourt, L. (2016). Identification of Vimentin as a Potential Therapeutic Target against HIV Infection. *Viruses*, 8(6). doi:10.3390/v8060098

- Ferri, G. L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P. J., & Polak, J. M. (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature*, 297(5865), 409-410. doi:10.1038/297409a0
- Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M., & Weber, K. (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(10), 5034-5038. doi:10.1073/pnas.75.10.5034
- Fuller, M. L., DeChant, A. K., Rothstein, B., Caprariello, A., Wang, R., Hall, A. K., & Miller, R. H. (2007). Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating spinal cord lesions. *Ann Neurol*, 62(3), 288-300. doi:10.1002/ana.21179
- Gentil, B. J., Delphin, C., Mbele, G. O., Deloulme, J. C., Ferro, M., Garin, J., & Baudier, J. (2001). The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for Ca²⁺ homeostasis regulation by S100B. *J Biol Chem*, 276(26), 23253-23261. doi:10.1074/jbc.M010655200
- Gimsa, U., ØRen, A., Pandiyan, P., Teichmann, D., Bechmann, I., Nitsch, R., & Brunner-Weinzierl, M. C. (2004). Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J Mol Med (Berl)*, 82(6), 364-372. doi:10.1007/s00109-004-0531-6
- Godbout, R., Bisgrove, D. A., Shkolny, D., & Day, R. S., 3rd. (1998). Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. *Oncogene*, 16(15), 1955-1962. doi:10.1038/sj.onc.1201740
- Godbout, R., Poon, H. Y., & Liu, R. Z. (2014). FABP7 (fatty acid binding protein 7, brain). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
- Goldie, K. N., Wedig, T., Mitra, A. K., Aebi, U., Herrmann, H., & Hoenger, A. (2007). Dissecting the 3-D structure of vimentin intermediate filaments by cryo-electron tomography. *J Struct Biol*, 158(3), 378-385. doi:10.1016/j.jsb.2006.12.007
- Groebe, A., Clarner, T., Baumgartner, W., Dang, J., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrogliosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum*, 8(3), 163-174. doi:10.1007/s12311-009-0099-3
- Grygorowicz, T., Wełniak-Kamińska, M., & Strużyńska, L. (2016). Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci*, 74, 1-9. doi:10.1016/j.mcn.2016.02.003
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci*, 8, 73. doi:10.3389/fncel.2014.00073
- Gudi, V., Škuljec, J., Yildiz, Ö., Frichert, K., Skripuletz, T., Moharreggh-Khiabani, D., . . . Stangel, M. (2011). Spatial and temporal profiles of growth factor expression during CNS demyelination reveal the dynamics of repair priming. *PLoS One*, 6(7), e22623. doi:10.1371/journal.pone.0022623

- Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V., & Legraverend, C. (2005). Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia*, *51*(2), 81-97. doi:10.1002/glia.20184
- Haim, L. B., & Rowitch, D. H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(1), 31-41. doi:10.1038/nrn.2016.159
- Hainfellner, J. A., Voigtländer, T., Ströbel, T., Mazal, P. R., Maddalena, A. S., Aguzzi, A., & Budka, H. (2001). Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol*, *60*(5), 449-461. doi:10.1093/jnen/60.5.449
- Hausmann, R., Riess, R., Fieguth, A., & Betz, P. (2000). Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *Int J Legal Med*, *113*(2), 70-75. doi:10.1007/pl00007711
- Hayes, C. E., Hubler, S. L., Moore, J. R., Barta, L. E., Praska, C. E., & Nashold, F. E. (2015). Vitamin D Actions on CD4(+) T Cells in Autoimmune Disease. *Front Immunol*, *6*, 100. doi:10.3389/fimmu.2015.00100
- Heizmann, C. W. (1999). Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res*, *24*(9), 1097-1100. doi:10.1023/a:1020700117665
- Heizmann, C. W., & Cox, J. A. (1998). New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biomaterials*, *11*(4), 383-397. doi:10.1023/a:1009212521172
- Heizmann, C. W., Fritz, G., & Schäfer, B. W. (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, *7*, d1356-1368.
- Helfand, B. T., Mikami, A., Vallee, R. B., & Goldman, R. D. (2002). A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *J Cell Biol*, *157*(5), 795-806. doi:10.1083/jcb.200202027
- Herrmann, H., & Aebi, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol*, *12*(1), 79-90. doi:10.1016/s0955-0674(99)00060-5
- Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V., & Aebi, U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(7), 562-573. doi:10.1038/nrm2197
- Hibbits, N., Pannu, R., Wu, T. J., & Armstrong, R. C. (2009). Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. *ASN Neuro*, *1*(3). doi:10.1042/an20090032
- Hibbits, N., Yoshino, J., Le, T. Q., & Armstrong, R. C. (2012). Astroglialosis during acute and chronic cuprizone demyelination and implications for remyelination. *ASN Neuro*, *4*(6), 393-408. doi:10.1042/an20120062
- Hiremath, M. M., Saito, Y., Knapp, G. W., Ting, J. P., Suzuki, K., & Matsushima, G. K. (1998). Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*, *92*(1-2), 38-49. doi:10.1016/s0165-5728(98)00168-4

- Hol, E. M., Roelofs, R. F., Moraal, E., Sonnemans, M. A., Sluijs, J. A., Proper, E. A., . . . van Leeuwen, F. W. (2003). Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Mol Psychiatry*, *8*(9), 786-796. doi:10.1038/sj.mp.4001379
- Holley, J. E., Gveric, D., Newcombe, J., Cuzner, M. L., & Gutowski, N. J. (2003). Astrocyte characterization in the multiple sclerosis glial scar. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *29*(5), 434-444. doi:10.1046/j.1365-2990.2003.00491.x
- Isobe, T., Nakajima, T., & Okuyama, T. (1977). Reinvestigation of extremely acidic proteins in bovine brain. *Biochim Biophys Acta*, *494*(1), 222-232. doi:10.1016/0005-2795(77)90150-7
- Isobe, T., Tsugita, A., & Okuyama, T. (1978). The amino acid sequence and the subunit structure of bovine brain S-100 protein (PAP I-b). *J Neurochem*, *30*(4), 921-923. doi:10.1111/j.1471-4159.1978.tb10805.x
- John, G. R., Lee, S. C., & Brosnan, C. F. (2003). Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist*, *9*(1), 10-22. doi:10.1177/1073858402239587
- Johnston-Wilson, N. L., Sims, C. D., Hofmann, J. P., Anderson, L., Shore, A. D., Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2000). Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry*, *5*(2), 142-149. doi:10.1038/sj.mp.4000696
- Jung, C. S., Foerch, C., Schänzer, A., Heck, A., Plate, K. H., Seifert, V., . . . Sitzer, M. (2007). Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*, *130*(Pt 12), 3336-3341. doi:10.1093/brain/awm263
- Kagawa, Y., Umaru, B. A., Ariful, I., Shil, S. K., Miyazaki, H., Yamamoto, Y., . . . Owada, Y. (2019). Role of FABP7 in tumor cell signaling. *Adv Biol Regul*, *71*, 206-218. doi:10.1016/j.jbior.2018.09.006
- Kaloshi, G., Mokhtari, K., Carpentier, C., Taillibert, S., Lejeune, J., Marie, Y., . . . Sanson, M. (2007). FABP7 expression in glioblastomas: relation to prognosis, invasion and EGFR status. *J Neurooncol*, *84*(3), 245-248. doi:10.1007/s11060-007-9377-4
- Kamizato, K., Sato, S., Shil, S. K., Umaru, B. A., Kagawa, Y., Yamamoto, Y., . . . Miyazaki, H. (2019). The role of fatty acid binding protein 7 in spinal cord astrocytes in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*, *409*, 120-129. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.03.050
- Kanno, T., Sasaki, S., Yamada, N., Kawasako, K., & Tsuchitani, M. (2012). Hexachlorophene and cuprizone induce the spongy change of the developing rat brain by different mechanisms: the role of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase). *J Vet Med Sci*, *74*(7), 837-843. doi:10.1292/jvms.11-0469
- Káradóttir, R., Cavelier, P., Bergersen, L. H., & Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*, *438*(7071), 1162-1166. doi:10.1038/nature04302

- Kassubek, R., Gorges, M., Schocke, M., Hagenston, V. A. M., Huss, A., Ludolph, A. C., . . . Tumani, H. (2017). GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. *Neurosci Lett*, *657*, 166-170. doi:10.1016/j.neulet.2017.07.050
- Kato, H., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Ohi, R., So, N., & Iwasaki, Y. (1990). Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, *25*(5), 514-519. doi:10.1016/0022-3468(90)90563-o
- Kepes, J. J., Rubinstein, L. J., & Chiang, H. (1984). The role of astrocytes in the formation of cartilage in gliomas. An immunohistochemical study of four cases. *Am J Pathol*, *117*(3), 471-483.
- Kerkerian, L., Nieoullon, A., & Dusticier, N. (1982). Brain glutamate uptake: Regional distribution study from sensorimotor areas in the cat. *Neurochem Int*, *4*(4), 275-281. doi:10.1016/0197-0186(82)90064-x
- Kidd, M. E., Shumaker, D. K., & Ridge, K. M. (2014). The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *50*(1), 1-6. doi:10.1165/rcmb.2013-0314TR
- Kimura, A., Takekoshi, A., Yoshikura, N., Hayashi, Y., & Shimohata, T. (2019). Clinical characteristics of autoimmune GFAP astrocytopathy. *J Neuroimmunol*, *332*, 91-98. doi:10.1016/j.jneuroim.2019.04.004
- Kingwell, E., Marriott, J. J., Jetté, N., Pringsheim, T., Makhani, N., Morrow, S. A., . . . Marrie, R. A. (2013). Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurology*, *13*(1), 128. doi:10.1186/1471-2377-13-128
- Kipp, M., & Baumgartner, W. (2011). „*The cuprizone model and multiple sclerosis: disparities and similarities*“. Dissertation.
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathologica*, *118*(6), 723-736. doi:10.1007/s00401-009-0591-3
- Kipp, M., Clarner, T., Gingele, S., Pott, F., Amor, S., van der Valk, P., & Beyer, C. (2011). Brain lipid binding protein (FABP7) as modulator of astrocyte function. *Physiol Res*, *60 Suppl 1*, S49-60.
- Kipp, M., Gingele, S., Pott, F., Clarner, T., van der Valk, P., Denecke, B., . . . Beyer, C. (2011). BLBP-expression in astrocytes during experimental demyelination and in human multiple sclerosis lesions. *Brain Behav Immun*, *25*(8), 1554-1568. doi:10.1016/j.bbi.2011.05.003
- Kipp, M., Norkute, A., Johann, S., Lorenz, L., Braun, A., Hieble, A., . . . Beyer, C. (2008). Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS exposure. *J Mol Neurosci*, *35*(2), 235-243. doi:10.1007/s12031-008-9057-7
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol*, *27*(2), 123-137. doi:10.1111/bpa.12454

- Koch-Henriksen, N., & Sørensen, P. S. (2010). The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*, 9(5), 520-532. doi:10.1016/s1474-4422(10)70064-8
- Kokkinos, M. I., Wafai, R., Wong, M. K., Newgreen, D. F., Thompson, E. W., & Waltham, M. (2007). Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*, 185(1-3), 191-203. doi:10.1159/000101320
- Koutsoudaki, P. N., Skripuletz, T., Gudi, V., Moharregg-Khiabani, D., Hildebrandt, H., Trebst, C., & Stangel, M. (2009). Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neurosci Lett*, 451(1), 83-88. doi:10.1016/j.neulet.2008.11.058
- Krupenko, S. A. (2009). FDH: an aldehyde dehydrogenase fusion enzyme in folate metabolism. *Chem Biol Interact*, 178(1-3), 84-93. doi:10.1016/j.cbi.2008.09.007
- Krupenko, S. A., & Oleinik, N. V. (2002). 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, one of the major folate enzymes, is down-regulated in tumor tissues and possesses suppressor effects on cancer cells. *Cell Growth Differ*, 13(5), 227-236.
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnütgen, F., Brüning, G., Spener, F., & Müller, T. (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development*, 120(9), 2637-2649.
- Kutzbach, C., & Stokstad, E. L. (1968). Partial purification of a 10-formyl-tetrahydrofolate: NADP oxidoreductase from mammalian liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 30(2), 111-117. doi:10.1016/0006-291x(68)90456-7
- Kutzbach, C., & Stokstad, E. L. (1971). 10-Formyltetrahydrofolate: NADP oxireductase. *Methods Enzymol* 8B: 793-798.
- Lanjakornsiripan, D., Pior, B. J., Kawaguchi, D., Furutachi, S., Tahara, T., Katsuyama, Y., . . . Gotoh, Y. (2018). Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. *Nat Commun*, 9(1), 1623. doi:10.1038/s41467-018-03940-3
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 223-244. doi:10.1007/s00401-016-1631-4
- Laurence, J. A., & Fatemi, S. H. (2005). Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum*, 4(3), 206-210. doi:10.1080/14734220500208846
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., & Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*, 172(1), 3-13. doi:10.1016/j.neurol.2015.10.006
- Liang, Y., Diehn, M., Watson, N., Bollen, A. W., Aldape, K. D., Nicholas, M. K., . . . Israel, M. A. (2005). Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(16), 5814-5819. doi:10.1073/pnas.0402870102
- Liedtke, W., Edelman, W., Bieri, P. L., Chiu, F. C., Cowan, N. J., Kucherlapati, R., & Raine, C. S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and

- long-term maintenance of myelination. *Neuron*, 17(4), 607-615. doi:10.1016/s0896-6273(00)80194-4
- Lindner, M., Heine, S., Haastert, K., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., . . . Stangel, M. (2008). Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34(1), 105-114. doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00879.x
- Liu, Z., Li, Y., Cui, Y., Roberts, C., Lu, M., Wilhelmsson, U., . . . Chopp, M. (2014). Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia*, 62(12), 2022-2033. doi:10.1002/glia.22723
- Loppin, M., Quillien, V., Adamski, H., Ollivier, I., Garlantézec, R., & Chevrant-Breton, J. (2007). [Protein S100 beta and Melanoma Inhibitory Activity (MIA): a prospective study of their clinical value for the early detection of metastasis in malignant melanoma]. *Ann Dermatol Venereol*, 134(6-7), 535-540. doi:10.1016/s0151-9638(07)89264-7
- Ludwin, S. K. (1978). Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab Invest*, 39(6), 597-612.
- Ludwin, S. K., Kosek, J. C., & Eng, L. F. (1976). The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol*, 165(2), 197-207. doi:10.1002/cne.901650206
- Marenholz, I., Heizmann, C. W., & Fritz, G. (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*, 322(4), 1111-1122. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.096
- Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*, 11(1), 107-116. doi:10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x
- Mbele, G. O., Deloulme, J. C., Gentil, B. J., Delphin, C., Ferro, M., Garin, J., . . . Baudier, J. (2002). The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *J Biol Chem*, 277(51), 49998-50007. doi:10.1074/jbc.M205363200
- Michetti, F., Corvino, V., Geloso, M. C., Lattanzi, W., Bernardini, C., Serpero, L., & Gazzolo, D. (2012). The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J Neurochem*, 120(5), 644-659. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07612.x
- Michetti, F., Dell'Anna, E., Tiberio, G., & Cocchia, D. (1983). Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res*, 262(2), 352-356. doi:10.1016/0006-8993(83)91032-6
- Michetti, F., Massaro, A., & Murazio, M. (1979). The nervous system-specific S-100 antigen in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett*, 11(2), 171-175. doi:10.1016/0304-3940(79)90122-8
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, 93(3), 421-443. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005

- Millward, T. A., Heizmann, C. W., Schäfer, B. W., & Hemmings, B. A. (1998). Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *Embo j*, *17*(20), 5913-5922. doi:10.1093/emboj/17.20.5913
- Mita, R., Coles, J. E., Glubrecht, D. D., Sung, R., Sun, X., & Godbout, R. (2007). B-FABP-expressing radial glial cells: the malignant glioma cell of origin? *Neoplasia*, *9*(9), 734-744. doi:10.1593/neo.07439
- Morel, L., Higashimori, H., Tolman, M., & Yang, Y. (2014). VGluT1+ neuronal glutamatergic signaling regulates postnatal developmental maturation of cortical protoplasmic astroglia. *J Neurosci*, *34*(33), 10950-10962. doi:10.1523/jneurosci.1167-14.2014
- Müller, M., Bhattacharya, S. S., Moore, T., Prescott, Q., Wedig, T., Herrmann, H., & Magin, T. M. (2009). Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Hum Mol Genet*, *18*(6), 1052-1057. doi:10.1093/hmg/ddn440
- Multiple Sclerosis International Federation. (2013). Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around The World. Retrieved from <https://www.msif.org/about-us/who-we-are-and-what-we-do/advocacy/atlas/>
- Nash, B., Ioannidou, K., & Barnett, S. C. (2011). Astrocyte phenotypes and their relationship to myelination. *J Anat*, *219*(1), 44-52. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01330.x
- NCBI. (2020a). Entrez Gene: ALDH1L1 aldehyde dehydrogenase 1 family member L1 [Homo sapiens (human)]. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10840#gene-expression>
- NCBI. (2020b). Entrez Gene: FABP7 fatty acid binding protein 7, brain. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=2173>
- Neymeyer, V., Tephly, T. R., & Miller, M. W. (1997). Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH) expression in the central nervous system of the mature rat. *Brain Res*, *766*(1-2), 195-204. doi:10.1016/s0006-8993(97)00528-3
- Nicaise Roland, P., Grootenboer Mignot, S., Bruns, A., Hurtado, M., Palazzo, E., Hayem, G., . . . Chollet Martin, S. (2008). Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy. *Arthritis Res Ther*, *10*(6), R142. doi:10.1186/ar2570
- Nielsen, A. L., Holm, I. E., Johansen, M., Bonven, B., Jørgensen, P., & Jørgensen, A. L. (2002). A new splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAP epsilon, interacts with the presenilin proteins. *J Biol Chem*, *277*(33), 29983-29991. doi:10.1074/jbc.M112121200
- Nieminen, M., Henttinen, T., Merinen, M., Marttila-Ichihara, F., Eriksson, J. E., & Jalkanen, S. (2006). Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol*, *8*(2), 156-162. doi:10.1038/ncb1355
- Nilsson, G. (1950). A New Colour Reaction on Copper and Certain Carbonyl Compounds. *Acta Chemica Scandinavica*.
- Nishikawa, T., Lee, I. S., Shiraishi, N., Ishikawa, T., Ohta, Y., & Nishikimi, M. (1997). Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-

- induced cell damage. *J Biol Chem*, 272(37), 23037-23041. doi:10.1074/jbc.272.37.23037
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., . . . Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*, 33(1), 72-86.
- Norkute, A., Hieble, A., Braun, A., Johann, S., Clarner, T., Baumgartner, W., . . . Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces demyelination and astrogliosis in the mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 87(6), 1343-1355. doi:10.1002/jnr.21946
- Oleinik, N. V., & Krupenko, S. A. (2003). Ectopic expression of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in A549 cells induces G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Cancer Res*, 1(8), 577-588.
- Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L. (2017). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 13(1), 25-36. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
- Orthmann-Murphy, J. L., Abrams, C. K., & Scherer, S. S. (2008). Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *J Mol Neurosci*, 35(1), 101-116. doi:10.1007/s12031-007-9027-5
- Owada, Y., Yoshimoto, T., & Kondo, H. (1996). Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. *J Chem Neuroanat*, 12(2), 113-122. doi:10.1016/s0891-0618(96)00192-5
- Pekny, M., Johansson, C. B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallén, A., Perlmann, T., . . . Frisén, J. (1999). Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol*, 145(3), 503-514. doi:10.1083/jcb.145.3.503
- Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427-434. doi:10.1002/glia.20207
- Perreau, J., Lilienbaum, A., Vasseur, M., & Paulin, D. (1988). Nucleotide sequence of the human vimentin gene and regulation of its transcription in tissues and cultured cells. *Gene*, 62(1), 7-16. doi:10.1016/0378-1119(88)90575-6
- Petzold, A., Eikelenboom, M. J., Gveric, D., Keir, G., Chapman, M., Lazeron, R. H., . . . Giovannoni, G. (2002). Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain*, 125(Pt 7), 1462-1473. doi:10.1093/brain/awf165
- Pierrot-Deseilligny, C., & Souberbielle, J. C. (2017). Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord*, 14, 35-45. doi:10.1016/j.msard.2017.03.014
- Pitt, D., Werner, P., & Raine, C. S. (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 6(1), 67-70. doi:10.1038/71555

- Ponath, G., Ramanan, S., Mubarak, M., Housley, W., Lee, S., Sahinkaya, F. R., . . . Pitt, D. (2017). Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain*, *140*(2), 399-413. doi:10.1093/brain/aww298
- Potokar, M., Morita, M., Wiche, G., & Jorgačevski, J. (2020). The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. *Cells*, *9*(7). doi:10.3390/cells9071604
- Pott, F., Gingele, S., Clarner, T., Dang, J., Baumgartner, W., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Res*, *1305*, 137-149. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.084
- Powell, E. M., & Geller, H. M. (1999). Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia*, *26*(1), 73-83. doi:10.1002/(sici)1098-1136(199903)26:1<73::aid-glia8>3.0.co;2-s
- Pozdnyakov, N., Goraczniak, R., Margulis, A., Duda, T., Sharma, R. K., Yoshida, A., & Sitaramayya, A. (1997). Structural and functional characterization of retinal calcium-dependent guanylate cyclase activator protein (CD-GCAP): identity with S100beta protein. *Biochemistry*, *36*(46), 14159-14166. doi:10.1021/bi971792l
- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., & Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*, *47*, 485-505. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.10.004
- Quax-Jeuken, Y. E., Quax, W. J., & Bloemendal, H. (1983). Primary and secondary structure of hamster vimentin predicted from the nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *80*(12), 3548-3552. doi:10.1073/pnas.80.12.3548
- Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*, *122*(4), 1164-1171. doi:10.1172/jci58644
- Reeves, S. A., Helman, L. J., Allison, A., & Israel, M. A. (1989). Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(13), 5178-5182. doi:10.1073/pnas.86.13.5178
- Regan, M. R., Huang, Y. H., Kim, Y. S., Dykes-Hoberg, M. I., Jin, L., Watkins, A. M., . . . Rothstein, J. D. (2007). Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J Neurosci*, *27*(25), 6607-6619. doi:10.1523/jneurosci.0790-07.2007
- Richardson, A. M., Havel, L. S., Koyen, A. E., Konen, J. M., Shupe, J., Wiles, W. G. t., . . . Marcus, A. I. (2018). Vimentin Is Required for Lung Adenocarcinoma Metastasis via Heterotypic Tumor Cell-Cancer-Associated Fibroblast Interactions during Collective Invasion. *Clin Cancer Res*, *24*(2), 420-432. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-1776
- Rickmann, M., & Wolff, J. R. (1995). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience*, *67*(4), 977-991. doi:10.1016/0306-4522(94)00615-c
- Riol, H., Tardy, M., Rolland, B., Lévesque, G., & Murthy, M. R. (1997). Detection of the peripheral nervous system (PNS)-type glial fibrillary acidic protein (GFAP) and its mRNA in human lymphocytes. *J Neurosci Res*, *48*(1), 53-62.

- Roelofs, R. F., Fischer, D. F., Houtman, S. H., Sluijs, J. A., Van Haren, W., Van Leeuwen, F. W., & Hol, E. M. (2005). Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton. *Glia*, *52*(4), 289-300. doi:10.1002/glia.20243
- Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2015). Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Semin Immunopathol*, *37*(6), 625-638. doi:10.1007/s00281-015-0515-3
- Rutka, J. T., Murakami, M., Dirks, P. B., Hubbard, S. L., Becker, L. E., Fukuyama, K., . . . Matsuzawa, K. (1997). Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J Neurosurg*, *87*(3), 420-430. doi:10.3171/jns.1997.87.3.0420
- Rutka, J. T., & Smith, S. L. (1993). Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acidic protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. *Cancer Res*, *53*(15), 3624-3631.
- Sadovnick, A. D., Ebers, G. C., Dyment, D. A., & Risch, N. J. (1996). Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet*, *347*(9017), 1728-1730. doi:10.1016/s0140-6736(96)90807-7
- Santello, M., & Volterra, A. (2010). Neuroscience: Astrocytes as aide-mémoires. *Nature*, *463*(7278), 169-170. doi:10.1038/463169a
- Scharl, M., Huber, N., Lang, S., Fürst, A., Jehle, E., & Rogler, G. (2015). Hallmarks of epithelial to mesenchymal transition are detectable in Crohn's disease associated intestinal fibrosis. *Clin Transl Med*, *4*, 1. doi:10.1186/s40169-015-0046-5
- Scheld, M., Rüther, B. J., Große-Veldmann, R., Ohl, K., Tenbrock, K., Drey Müller, D., . . . Kipp, M. (2016). Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *The Journal of Neuroscience*, *36*(4), 1410-1415. doi:10.1523/jneurosci.2456-15.2016
- Schmidt, T., Awad, H., Slowik, A., Beyer, C., Kipp, M., & Clarner, T. (2013). Regional Heterogeneity of Cuprizone-Induced Demyelination: Topographical Aspects of the Midline of the Corpus Callosum. *Journal of Molecular Neuroscience*, *49*(1), 80-88. doi:10.1007/s12031-012-9896-0
- Sharifi, K., Ebrahimi, M., Kagawa, Y., Islam, A., Tuerxun, T., Yasumoto, Y., . . . Owada, Y. (2013). Differential expression and regulatory roles of FABP5 and FABP7 in oligodendrocyte lineage cells. *Cell Tissue Res*, *354*(3), 683-695. doi:10.1007/s00441-013-1730-7
- Sharifi, K., Morihiro, Y., Maekawa, M., Yasumoto, Y., Hoshi, H., Adachi, Y., . . . Owada, Y. (2011). FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. *Histochem Cell Biol*, *136*(5), 501-513. doi:10.1007/s00418-011-0865-4
- Sharp, G., Osborn, M., & Weber, K. (1982). Occurrence of two different intermediate filament proteins in the same filament in situ within a human glioma cell line. An immunoelectron microscopical study. *Exp Cell Res*, *141*(2), 385-395. doi:10.1016/0014-4827(82)90227-0

- Shen, W. J., Zaidi, S. K., Patel, S., Cortez, Y., Ueno, M., Azhar, R., . . . Kraemer, F. B. (2012). Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinology*, *153*(7), 3249-3257. doi:10.1210/en.2012-1048
- Sidman, R. L., Angevine, J. B., Pierce, E. T., Korsaras, B., Misra, B., & Senft, S. (1971). High resolution Mouse Brain Atlas. In: Harvard University Press.
- Skripuletz, T., Bussmann, J. H., Gudi, V., Koutsoudaki, P. N., Pul, R., Moharreggh-Khiabani, D., . . . Stangel, M. (2010). Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain Pathol*, *20*(2), 301-312. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00271.x
- Skripuletz, T., Gudi, V., Hackstette, D., & Stangel, M. (2011). De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: the old, the new, and the unexpected. *Histol Histopathol*, *26*(12), 1585-1597. doi:10.14670/hh-26.1585
- Skripuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., . . . Stangel, M. (2008). Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol*, *172*(4), 1053-1061. doi:10.2353/ajpath.2008.070850
- Smith, S. P., Barber, K. R., Dunn, S. D., & Shaw, G. S. (1996). Structural influence of cation binding to recombinant human brain S100b: evidence for calcium-induced exposure of a hydrophobic surface. *Biochemistry*, *35*(27), 8805-8814. doi:10.1021/bi952698c
- Smith, T., Groom, A., Zhu, B., & Turski, L. (2000). Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med*, *6*(1), 62-66. doi:10.1038/71548
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(5), 249-263. doi:10.1038/nrn3898
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Steelman, A. J., Thompson, J. P., & Li, J. (2012). Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. *Neurosci Res*, *72*(1), 32-42. doi:10.1016/j.neures.2011.10.002
- Stefansson, K., Wollmann, R. L., Moore, B. W., & Arnason, B. G. (1982). S-100 protein in human chondrocytes. *Nature*, *295*(5844), 63-64. doi:10.1038/295063a0
- Steinman, L., & Zamvil, S. S. (2006). How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol*, *60*(1), 12-21. doi:10.1002/ana.20913
- Suzuki, K. (1969). Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone. *Science*, *163*(3862), 81-82. doi:10.1126/science.163.3862.81
- Tang, D. (2008). Intermediate filaments in smooth muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*, *294*, C869-878. doi:10.1152/ajpcell.00154.2007
- Taylor, L. C., Gilmore, W., & Matsushima, G. K. (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol*, *19*(3), 467-479. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00230.x

- Thelin, E. P., Tajsic, T., Zeiler, F. A., Menon, D. K., Hutchinson, P. J. A., Carpenter, K. L. H., . . . Helmy, A. (2017). Monitoring the Neuroinflammatory Response Following Acute Brain Injury. *Front Neurol*, 8, 351. doi:10.3389/fneur.2017.00351
- Toda, M., Miura, M., Asou, H., Toya, S., & Uyemura, K. (1994). Cell growth suppression of astrocytoma C6 cells by glial fibrillary acidic protein cDNA transfection. *J Neurochem*, 63(5), 1975-1978. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.63051975.x
- Torkildsen, O., Brunborg, L. A., Myhr, K. M., & Bø, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl*, 188, 72-76. doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x
- Triolo, D., Dina, G., Taveggia, C., Vaccari, I., Porrello, E., Rivellini, C., . . . Previtalli, S. C. (2012). Vimentin regulates peripheral nerve myelination. *Development*, 139(7), 1359-1367. doi:10.1242/dev.072371
- Tso, C. L., Shintaku, P., Chen, J., Liu, Q., Liu, J., Chen, Z., . . . Nelson, S. F. (2006). Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res*, 4(9), 607-619. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-06-0005
- Tsoporis, J. N., Overgaard, C. B., Izhar, S., & Parker, T. G. (2009). S100B modulates the hemodynamic response to norepinephrine stimulation. *Am J Hypertens*, 22(10), 1048-1053. doi:10.1038/ajh.2009.145
- Tubaro, C., Arcuri, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2010). S100B protein in myoblasts modulates myogenic differentiation via NF-kappaB-dependent inhibition of MyoD expression. *J Cell Physiol*, 223(1), 270-282. doi:10.1002/jcp.22035
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504), 657-661. doi:10.1126/science.291.5504.657
- Vandyke Carter, H., & Gray, H. (1918). *Anatomy of the Human Body*. In P. 623 (Ed.). Philadelphia and New York.
- Ventura, R., & Harris, K. M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci*, 19(16), 6897-6906. doi:10.1523/jneurosci.19-16-06897.1999
- Venturini, G. (1973). Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizone treatment in vivo. *J Neurochem*, 21(5), 1147-1151. doi:10.1111/j.1471-4159.1973.tb07569.x
- Viale, G., Gambacorta, M., Coggi, G., Dell'Orto, P., Milani, M., & Doglioni, C. (1991). Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in normal and diseased human breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 418(4), 339-348. doi:10.1007/bf01600164
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3865-3895. doi:10.1002/cne.24040

- Walz, W., & Lang, M. K. (1998). Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 257(3), 127-130. doi:10.1016/s0304-3940(98)00813-1
- Wang, D. D., & Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*, 86(4), 342-367. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.09.015
- Weber, K., & Geisler, N. (1985). Intermediate filaments: structural conservation and divergence. *Ann N Y Acad Sci*, 455, 126-143. doi:10.1111/j.1749-6632.1985.tb50408.x
- Weinstein, D. E., Shelanski, M. L., & Liem, R. K. (1991). Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol*, 112(6), 1205-1213. doi:10.1083/jcb.112.6.1205
- Yamada, T., Kawamata, T., Walker, D. G., & McGeer, P. L. (1992). Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol*, 84(2), 157-162. doi:10.1007/bf00311389
- Yang, Q., Hamberger, A., Hyden, H., Wang, S., Stigbrand, T., & Haglid, K. G. (1995). S-100 beta has a neuronal localisation in the rat hindbrain revealed by an antigen retrieval method. *Brain Res*, 696(1-2), 49-61. doi:10.1016/0006-8993(95)00755-f
- Yang, Y., Vidensky, S., Jin, L., Jie, C., Lorenzini, I., Frankl, M., & Rothstein, J. D. (2011). Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia*, 59(2), 200-207. doi:10.1002/glia.21089
- Yoon, H., Walters, G., Paulsen, A. R., & Scarisbrick, I. A. (2017). Astrocyte heterogeneity across the brain and spinal cord occurs developmentally, in adulthood and in response to demyelination. *PLoS One*, 12(7), e0180697. doi:10.1371/journal.pone.0180697
- Zelenika, D., Grima, B., Brenner, M., & Pessac, B. (1995). A novel glial fibrillary acidic protein mRNA lacking exon 1. *Brain Res Mol Brain Res*, 30(2), 251-258. doi:10.1016/0169-328x(95)00010-p
- Zhang, X., Fournier, M. V., Ware, J. L., Bissell, M. J., Yacoub, A., & Zehner, Z. E. (2009). Inhibition of vimentin or beta1 integrin reverts morphology of prostate tumor cells grown in laminin-rich extracellular matrix gels and reduces tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther*, 8(3), 499-508. doi:10.1158/1535-7163.Mct-08-0544
- Zhu, L., Ramboz, S., Hewitt, D., Boring, L., Grass, D. S., & Purchio, A. F. (2004). Non-invasive imaging of GFAP expression after neuronal damage in mice. *Neurosci Lett*, 367(2), 210-212. doi:10.1016/j.neulet.2004.06.020
- Zimmer, D. B., & Van Eldik, L. J. (1986). Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem*, 261(24), 11424-11428.