

Aus dem Institut für Neuroanatomie Lehrstuhl II

Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

***Quantifizierung & Visualisierung von
neurodegenerativen Aspekten der Multiplen Sklerose im
Cuprizon-Mausmodell: Neuronenverlust, axonaler
mitochondrialer Schaden***

Dissertation

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

vorgelegt von
Selina Schmutz
aus
Korneuburg
Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Nelson
PD Dr. med. Joachim Havla
PD Dr. med. Astrid Blaschek

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Zusammenfassung	5
2 Einleitung	6
2.1 <i>Multiple Sklerose</i>	6
2.2 <i>Neuronenverlust</i>	7
2.3 <i>Axonaler Schaden</i>	7
2.4 <i>Cuprizone Modell</i>	9
3 Fragestellung	11
4 Material und Methoden	12
4.1 <i>Chemikalien / Materialien für die Perfusion, Einbettung und Schnittherstellung</i>	12
4.2 <i>Chemikalien und Materialien, für die IHC / Immunfluoreszenz</i>	13
4.3 <i>Übersicht der Versuche</i>	13
4.4 <i>Versuchstiere</i>	14
4.5 <i>Färbungen</i>	15
4.6 <i>Auswertung</i>	19
4.7 <i>Statistische Auswertung</i>	23
5 Ergebnisse	24
5.1 <i>Validierung des Cuprizone Modells: Cuprizone induziert Demyelinisierung im CC</i>	24
5.2 <i>Cuprizone-Intoxikation führt zu keiner signifikanten Veränderung der PV⁺ Interneuronenzahl im Kortex</i>	25
5.3 <i>Cuprizone-Intoxikation führt zu akutem axonalem Schaden</i>	26
6 Diskussion	31
7 Abbildungsverzeichnis	35
8 Tabellenverzeichnis	37
9 Literaturverzeichnis	38
10 Eidesstattliche Versicherung	46
11 Danksagung	47

Abkürzungsverzeichnis

APP engl. Amyloid Precursor Protein

BDNF engl. Brain-derived Neurotrophic Factor

CC Corpus callosum

CNPase 2,3-zyklische Nukleotid-3-Phosphodiesterase

COX IV Cyclooxygenase IV

Cuprizone Cuprizone

DMTs krankheitsmodifizierende Medikamente

EAE Experimentelle autoimmune Enzephalitis

FGF-2 Fibroblast Growth Factor 2

GABA Gamma-Aminobuttersäure

IHC Immunhistochemie

kDa Kilodalton

MBP Myelin-Basisches-Protein

MS Multiple Sklerose

MOG Myelin-Oligodendrozyten-Protein

NES Normales Esel Serum

NZS Normales Ziege Serum

NNA N-Acetyl Aspartat

OT Objektträger

PBS Phosphate-buffered saline

PFA Paraformaldehyde

PLP Proteolipid-Protein

PV Parvalbumin

RRMS Schubförmig remittierende MS

ROI Region of Interest

sNFL Serum Neurofilament Light Chain

SPMS sekundär progrediente Multiple Sklerose

VDAC1 Voltage-dependent anion channel-1

ZNS Zentralnervensystem

1 Zusammenfassung

Neurodegeneration, insbesondere Neuronenverlust sowie axonaler Schaden tragen maßgeblich zur Krankheitsprogression bei an Multipler Sklerose erkrankten Patienten bei. Ziel meiner Arbeit ist es, diese beiden Aspekte anhand des Cuprizone-Tiermodells genauer zu untersuchen.

Um einen möglichen Neuronenverlust zu quantifizieren, wurden 5 Wochen mit 0,25 %-Cuprizone intoxizierte C57BL/6J Mäuse perfundiert, immunhistochemisch gegen Parvalbumin gefärbt und die Parvalbumin⁺ Interneurone stereologisch ausgewertet. Dabei zeigte sich kein signifikanter Verlust an Parvalbumin⁺ Interneuronen im Cortex im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zur Erfassung eventueller axonaler Schäden wurde nach Validierung des Cuprizone-Modells mittels anti-Proteolipid-Protein -Färbung, eine immunhistochemische-Färbung gegen das Vesikelprotein Amyloid Precursor Protein, einem bereits etablierten Marker für axonalen Schaden, von je 1, 3 und 5 Wochen Cuprizone-intoxizierten Tieren und einer Kontrollgruppe vorgenommen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Cuprizone-Intoxikation zu akutem axonalen Schaden führt, welcher sich in Form von Amyloid Precursor Protein⁺ Sphäroiden im Corpus callosum immunhistochemisch darstellen lässt.

Zur Untersuchung einer möglichen Beeinträchtigung mitochondrialer Proteine durch den geschädigten axonalen Transport wurden zwei Färbungen gegen Cyclooxygenase IV und Voltage-dependent anion channel-1 vorgenommen. Dabei konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein hoch signifikantes Zählergebnis an Cyclooxygenase IV⁺ und Voltage-dependent anion channel-1⁺ Sphäroiden im Corpus callosum nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation ermittelt werden. Zusätzlich wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Amyloid Precursor Protein und Cyclooxygenase IV durchgeführt, um einen möglichen örtlichen Zusammenhang von Mitochondrienbestandteilen und Amyloid Precursor Protein⁺ Sphäroiden zu eruieren. Die Ergebnisse zeigen, dass Amyloid Precursor Protein⁺ und Cyclooxygenase IV⁺ Sphäroide zu 20 % kolokalisieren.

Diese Arbeit kommt somit zu dem Ergebnis, dass Cuprizone-induzierte akute Demyelinisierung zu axonalen vesikulären als auch zu mitochondrialen Transportdefiziten führt. Sie liefert zudem neue Markerproteine, um axonalen Schaden zu visualisieren und trägt zum weiteren Verständnis der komplexen axonalen Transportmaschinerie der progressiven Multiplen Sklerose bei.

2 Einleitung

2.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, die durch Degeneration von Myelinscheiden des Zentralnervensystems (ZNS), inflammatorische Infiltrate und neuronalen Schaden charakterisiert ist. Obwohl einige Faktoren, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen, bekannt sind, bleibt der genaue Pathomechanismus bislang ungeklärt. Bisherige wissenschaftliche Studien zeigen, dass Umweltfaktoren wie eine Epstein Barr Virus Infektion, niedriger Vitamin D Spiegel und Zigarettenkonsum, sowie genetische Faktoren, insbesondere HLA Varianten, die Entstehung dieser Erkrankung begünstigen (Dendrou et al., 2015). Diese Arbeit soll ein Beitrag zum besseren Verständnis der durch MS hervorgerufenen pathologischen Vorgänge im ZNS sein.

Die Mehrzahl der MS Patienten durchläuft während ihrer Erkrankung verschiedene Phasen. Zu Beginn der Erkrankung können wiederkehrende Episoden von entzündlichen und demyelinisierenden Prozessen vorkommen, von denen sich der Patient vollkommen erholen kann (relapsing-remitting, RRMS). Nach etwa einer Dekade ändert sich meist das klinische Krankheitsbild, die Schubrate tritt in den Hintergrund, klinisch imponiert nunmehr eine ständige, schubunabhängige Krankheitsprogression. Diese zweite Phase wird sekundär progrediente MS (SPMS) genannt (Rovaris et al., 2006; Trapp et al., 2008).

Die meisten Medikamente haben vor allem während der schubförmig remittierende MS ihre Wirksamkeit und wirken entweder immunmodulatorisch oder immunsuppressiv (Oh et al., 2015). Leider haben diese Therapiestrategien keinen, oder nur einen geringen Einfluss auf die progressive Phase (Wingerchuk et al., 2014). Verschiedenste Behandlungsstrategien sind vorhanden, um die Entzündung einzudämmen (Ruiz et al., 2019). Beispielsweise werden hohe Dosen an Glucocorticoiden zur Verkürzung der Schubdauer eingesetzt. Jedoch haben Glucocorticoide keinen Einfluss auf die langfristige Krankheitsprogression der MS und werden nicht als krankheitsmodifizierende Medikamente (DMTs) bezeichnet (Tischner et al., 2007). DMTs werden in zwei Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe führt zu einer kontinuierlichen Immunsuppression; die zweite ist eine Immuninduktionstherapie, wobei das Immunsystem verändert wird und dadurch weniger anfällig ist. Kommt es zu einem progressiven Verlauf, sind die meisten DMTs unwirksam (Ruiz et al., 2019). Derartige Verlaufsformen werden, nach derzeitigem Wissensstand, vor allem durch neurodegenerative Schäden verursacht. Es wird angenommen, dass axonaler Schaden ein wichtiger Aspekt ist, der zum Fortschritt der Erkrankung führt (Kornek et al., 2000; Trapp et al., 1999).

Im progressiven Verlauf der Erkrankung erreichen die langsam fortschreitenden degenerativen Prozesse eine spezifische Schwelle und werden klinisch bemerkbar. Zwei Mechanismen spielen dabei eine Rolle: Erstens können Funktionen von geschädigten Neuronen auch von benachbarten Neuronen ausgeführt werden, ein Prozess der auch neuronale Plastizität genannt wird (Penner et al., 2017, Enzinger et al., 2016). Zweitens muss der Ausfall von einem oder mehreren Neuronen sich nicht direkt in neurologischen Defiziten äußern. Anschaulich lässt sich das am Beispiel eines mit 1000 Bällen gefüllten Behälters darstellen. Entnimmt man dem Behälter einen einzigen Ball, wird dieser kaum als fehlend realisiert werden. Sind jedoch nur noch zwei Bälle im Behälter vorhanden, wird nicht un bemerkt bleiben, wenn man einen Ball entfernt. Während der RRMS Erkrankungs-Phase wird der initiale Verlust von neuronalen Strukturen vom Patienten nicht wahrgenommen und führt nicht zu klinischen Symptomen. Später im Verlauf der Erkrankung, während des Übergangs von der RRMS zur SPMS-Phase, wenn bereits viele neuronale Schäden entstanden sind, wird der zusätzliche Verlust von neuronalen Strukturen klinisch relevant (Jianshan et al., 2020).

Bisherige wissenschaftliche Arbeiten konzentrierten sich vor allem auf die inflammatorischen Prozesse der Erkrankung. Im Gegensatz dazu werden den neurodegenerativen Aspekten der Erkrankung wesentlich weniger Beachtung geschenkt. Insbesondere die Methoden zur Erfassung der neurodegenerativen Prozesse befinden sich noch in der Anfangsphase (Wagenknecht et al., 2016). Aus diesem

Grund ist es von höchster Relevanz, dass die neurodegenerativen Aspekte weiter erforscht werden (Barkhof et al., 2009; Sormani et al., 2014).

2.2 Neuronenverlust

In Gehirnen von MS-Patientin können im Verlauf der Erkrankung alle neuronalen subzellulären Strukturen wie Axone, Dendriten oder synaptische Fortsätze zerstört werden (Dutta et al., 2011, Jurgens et al., 2016, Trapp et al., 1998). Schlussendlich können sogar ganze Nervenzellen verloren gehen (Peterson et al., 2001, Kipp et al., 2017).

Ergebnisse vieler Studien zeigen, dass neuro-axonale Degeneration in den grauen Substanz, im Gegensatz zu Schäden in der weißen Substanz, der bessere Prognosewert für den Krankheitsfortschritt ist (Calabrese et al., 2015; Dutta & Trapp 2014; Kipp et al., 2015). Jedoch sind die pathophysiologischen Auslöser, die zu neuro-axonaler Degeneration in der grauen Substanz führen, wenig verstanden. Darüber hinaus fehlen etablierte bildgebende Verfahren, um das Ausmaß des neuronalen Verlusts bei MS Patienten verlässlich zu quantifizieren (Wagenknecht et al., 2016).

Um zu verstehen, wie es zu neuronalen Verlusten kommt, muss beachtet werden, dass Neurone nicht nur durch eine Weitergabe des elektrischen Signales an der Synapse kommunizieren. Sie tauschen auch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie BDNF oder FGF-2, durch anterograden oder retrograden trans-neuralen Transport aus (Ferguson et al., 1990; Dieni et al., 2012; Figueiredo et al., 2008). Im synaptischen Spalt können diese Faktoren die prä- und postsynaptische Funktion und das neuronale Überleben regulieren (McCabe et al., 2012; Nikolettou et al., 2010). Aus diesem Grund können diffuse neurodegenerative Veränderungen am besten in Gehirnregionen mit großem Vernetzungsgrad erforscht werden (Wagenknecht et al., 2016). Eine dieser Strukturen ist der Kortex.

Der Kortex besteht neben Pyramidenzellen, Körnerzellen Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia aus inhibitorischen Interneuronen. Diese Interneurone dienen der Kommunikation zwischen Neuronen innerhalb des Kortex und verlassen mit ihren Projektionen den Kortex nicht (Trepel et al., 2011).

Analysen des motorischen Kortex von menschlichen *post-mortem* MS-Gehirnen zeigen im Vergleich zu gesunden Kontroll-Gehirnen eine Verminderung der Expression von verschiedenen Genen, welche bedeutend für die Transmission von GABA-haltigen inhibitorischen Neuronen sind (Dutta et al., 2006). GABA-haltige inhibitorische Interneurone kann man, je nach der Expression von verschiedenen Calcium-bindenden Proteinen wie Parvalbumin (PV) und Calretinin unterteilen (DeFelipe, 1997; Grateron et al., 2003; Cotter et al., 2002). Beide Proteine sind für die Pufferung von intrazellulärem Calcium zuständig (Baldellon et al., 1998). Defekte bei der Expression von Calcium-bindenden Proteinen sind für neurologische Pathologien wie der MS mitverantwortlich (Beers et al., 2001; Eyels et al., 2002). Im Speziellen wurde in normal-erscheinender grauer Substanz von MS Patienten eine Verminderung der Expression des PV-Gens beobachtet (Dutta et al., 2006). Eine *post-mortem* Analyse von MS Patienten zeigte eine Verminderung an PV⁺ Interneuronen des motorischen Kortex (Clements et al., 2008).

2.3 Axonaler Schaden

Im Verlauf der MS können Defekte an den Nervenfasern (Axonen) entstehen. Diese werden als „axonaler Schaden“ bezeichnet. Subtile axonale Schäden sind teilweise reversibel. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit einem Rückgang des zuvor entstandenen entzündlich bedingten Ödems (Nikic et al., 2011). Die Details der permanenten axonalen Schädigung *in vivo* sind noch ungeklärt. Untersuchungen *in vitro* und von *post-mortem* Präparaten geben Hinweise auf eine Immun-Zell vermittelte Pathogenese (e.g. Trapp et al., 2008, Lucchinetti et al., 2000, Waxman et al., 2006).

Axonaler Schaden kann in zwei verschiedene Arten eingeteilt werden (Buddeberg et al., 2003). Der frühe axonale Schaden ist zum Teil reversibel und kann durch die Konzentration von N-Acetyl-Aspartat (NAA), einem spezifischen Marker für Neurone und neuronale Fortsätze, geschätzt werden. Ist der NAA-Spiegel vermindert, lässt dies auf eine reduzierte Anzahl neuronaler Strukturen schließen. Bjartmar et al. (2000) fanden heraus, dass der bereits verminderte NAA-Spiegel in akuten Läsionen im

Verlauf der Erkrankung mit dem Rückgang der klinischen Symptome wieder ansteigen kann. Dies lässt auf eine vorübergehende Wiederherstellung der axonalen Funktion schließen (Bjartmar et al., 2000).

Wenn es zur Progression persistierender klinischer Beeinträchtigungen kommt, nimmt man an, dass die axonale Schädigung ein kritisches Ausmaß überschritten hat. Man spricht dann von der späten axonalen Schädigung (Buddeberg et al., 2003).

In einem intakten Neuron werden u.a. Zellorganellen im Zellkörper (Perikaryon) synthetisiert und entlang des Axons zur Synapse transportiert. Der Transport vom Zellkörper zur Synapse wird auch anterograder Transport genannt. Umgekehrt, zum Perikaryon hin, spricht man von retrogradem axonalen Transport (Trepel et al., 2011). Ladungen in Vesikeln werden größtenteils mittels schnellem axonalen Transport (100-400 mm/Tag, 1-5 $\mu\text{m/s}$) weitergeleitet. Hingegen werden Anteile des Zytoskeletts wie Mikrotubuli, Neurofilamente und Aktin mittels langsamem axonalen Transport (0.2-5 mm/Tag oder 0,0002-0,05 $\mu\text{m/s}$) geliefert (Roy et al., 2005).

Der beeinträchtigte axonale Transport kann mittels immunhistochemischer Färbung der akkumulierten Proteine sichtbar gemacht werden (Kuhlmann et al., 2002, Schirmer et al., 2011, Trapp et al., 1998, Gudi et al., 2017). Der am häufigsten benutzte Marker, um axonale Transportdefizite zu visualisieren, ist das Amyloid Precursor Protein (APP) (Gudi et al., 2017). APP ist ein integrales Membranglykoprotein, welches vom Zellkörper mittels schnellem, anterogradem axonalen Transport Richtung Axonende transportiert wird (Koo et al., 1990). Am Axonende soll APP für die Regulation der synaptischen Aktivität und Stabilität verantwortlich sein (Groemer et al., 2011, Tyan et al., 2012). Im Falle eines Transportdefizites kommt es zu der für axonale Schädigung spezifischen Bildung von Sphäroiden. In den Sphäroiden ist die APP Konzentration so hoch, dass sie mittels immunhistochemischer Färbung sichtbar gemacht werden können. (Sherriff et al., 1994, Stone JR et al., 2000).

Ein anderer Biomarker für axonalen Schaden ist das Serum Neurofilament Light Chain (sNfL). Neurofilament ist ein großer Bestandteil des axonalen Zytoskeletts und wird bei einer axonalen Schädigung in den Liquor und somit auch ins Blut freigesetzt (Teunissen et al., 2012). Er kann als Prognosefaktor zu Beginn der Erkrankung eingesetzt werden (Disanto et al., 2017). Synaptophysin ist ein Transmembranprotein, welches in verschiedene Vorgänge wie Exo- und Endozytose involviert ist (Valtorta et al., 2004). Es kann auch als Marker für axonalen Schaden verwendet werden (Gudi et al., 2017).

Um die Funktion des Neurons aufrechtzuerhalten, ist der Transport von Vesikeln besonders wichtig (Hennequin et al., 2017, Sheng et al., 2002). Vor allem ein ausgewogener mitochondrialer Transport ist von entscheidender Bedeutung, um axonale Integrität zu gewährleisten. Die meisten Mitochondrien werden vom Zellkörper entlang des mikrotubulären Netzwerks von mikrotubulären Motorproteinen zu Bereichen mit hoher Energienachfrage transportiert. Im Zuge einer Demyelinisierung, wird der Energieverbrauch gesteigert (Andrews et al., 2006). Um der hohen Energienachfrage gerecht zu werden, erhöht sich die Dichte an aktivitätsgesteigerten Mitochondrien in den demyelinisierten Bereichen des Axons (Ohno et al., 2014, Han et al., 2016). Eine erhöhte Dichte an Mitochondrien ist demnach bedeutsam für die Regeneration des Axons (Han et al., 2016).

Cytochrome C Oxidase (COX IV) und Voltage-Dependent Anion-Selective Channel 1 (VDAC1) sind beides Bestandteile des Mitochondriums. COX IV befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran, wohingegen VDAC1, auch bekannt als mitochondriales Porin, ein Kanal der äußeren Mitochondrienmembran ist. COX ist ein hetero-oligomeres Enzym bestehend aus 13 Untereinheiten, lokalisiert in der inneren Mitochondrienmembran (Ostermeier et al., 1996, Kadenbach et al., 2000). Es ist der letzte Enzymkomplex in der Atmungskette, welcher die Oxidation von Cytochrom C und die damit verbundene Elektronenübertragung, sowie die Reduktion von O_2 zu H_2O katalysiert (Barrientos, et al., 2002).

VDAC-1, ein β -Fass Protein, ist für die freie Diffusion von Molekülen durch die äußere mitochondriale Membran verantwortlich. Zusätzlich regelt es den Durchtritt von anionischen Molekülen wie

Chlorid, Phosphat oder Nukleotiden (Van der Haiden et al., 2001). Mittels spezifischer Antikörper können die beiden Bestandteile der Mitochondrien immunhistochemisch visualisiert werden.

2.4 Cuprizone Modell

Das Cuprizone-Modell ist ein toxisches Tiermodell. Dabei wird den Individuen der Kupferchelator Cuprizone oral verabreicht. Bereits nach einigen Tagen induziert dieser die Apoptose reifer Oligodendrozyten. Anschließend kommt es zur Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems im Gehirn (Astrozyten, Microglia) welche schlussendlich zur Demyelinisierung der weißen und grauen Substanz führen. Obwohl kleine Schäden der Blut-Hirn-Schranke im Cuprizone-Modell beschrieben sind (Berghoff et al., 2017), spielen Zellen der adaptiven Immunabwehr insbesondere T- und B-Zellen während der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung eine untergeordnete Rolle (Hiremath et al., 2008). Das Cuprizone-Modell weist einige wichtige Charakteristika der progressiven Phase der MS auf (Jiangshan et al., 2020).

Schon im Jahre 1960 wurde die Wirkung des Kupferchelators Cuprizone an Tieren durch William Carlton getestet. Er stellte fest, dass es dabei zu Läsionen im ZNS von verschiedenen Versuchstieren kommt (Carlton, 1966, 1967, 1969). In den folgenden Jahren erkannte man, dass neben der Dosierung und Dauer der Cuprizone-Gabe auch das Geschlecht, das Gewicht, der Stamm und das Alter der Versuchstiere entscheidend für die Ergebnisse einer Studie sind (Gudi, et al., 2014). Je nach Mausstamm (SJL und BALB/cj vs C57BL/6) konnten nach Cuprizone-Intoxikation deutliche Unterschiede in der Demyelinisierung erkannt werden (Skripuletz et al., 2008; Taylor et al., 2009). Eine Dosierung von 0,2-0,25 % Cuprizone in normalem Futter von Mäusen des Stammes C57BL/6 bewirkt beispielsweise eine reproduzierbare und synchrone Demyelinisierung des ZNS (akute Demyelinisierung), bei gleichzeitig geringer Hepatotoxizität. Zudem führt eine 5-6-wöchige Cuprizone-Intoxikation zu einer vollständigen Demyelinisierung des medialen Corpus Callosums (CC) (Hiremath et al., 1998). Wird anschließend die Cuprizone-Intoxikation beendet, kommt es zu Remyelinisierungsvorgängen (Kipp et al., 2009). Dies kann auf molekularer Ebene durch verschiedene Marker und durch die Expression von Myelinproteinen (2,3-zyklische Nukleotid-3-Phosphodiesterase (CNPase), Myelin-Basisches-Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG), Proteolipid Protein (PLP) sichtbar gemacht werden (Lindner et al., 2008). Nach einer 12-wöchigen Behandlung kommt es zu einer chronischen Demyelinisierung. Remyelinisierungsprozesse werden nach dieser Zeit kaum mehr beobachtet (Kipp et al., 2009).

Obwohl man anfangs davon ausging, dass Cuprizone primär einen Effekt auf die weiße Substanz im Bereich des medialen CC hat (Torkildsen et al., 2008), zeigen neuere Studien, dass es auch im Bereich des Kortex (Kipp et al., 2011), des Hippocampus (Norkute et al., 2009), des Cerebellums (Groebe et al., 2009) und in Teilen der Basalganglien (Pott et al., 2009) zur Ausbildung von Läsionen kommen kann.

Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus von Cuprizone nicht vollständig verstanden ist, nimmt man an, dass der Kupferchelator hemmend auf mitochondriale Enzyme der Atmungskette, die Kupfer als Co-Faktor verwenden, wirkt. Die Störung der Atmungskette und der daraus resultierende Energiemangel führt zu oxidativem Stress (Praet et al., 2014). Dieser wiederum führt zur Apoptose von Oligodendrozyten und letztendlich zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (Matsushima et al., 2001).

Parallelen zwischen den Cuprizone-induzierten Läsionen der Versuchstiere und den Veränderungen in *post-mortem* Material von MS Patienten sind vor allem unspezifische Myelin- und axonale Schäden, Aktivierung von Kaskaden die zu oxidativem Stress führen und eine relative Aufrechthaltung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Draheim et al., 2016)

Durch axonale Transportdefizite entstandene, immunhistochemisch angefärbte APP⁺ Sphäroide wurden in Läsionen von MS Patienten und in Tiermodellen, wie dem Cuprizone-Modell, entdeckt (Hoflich et al., 2016). Bei MS Patienten korrelieren die APP⁺ Akkumulationen mit der Anzahl an Makrophagen und CD8⁺ T-Lymphozyten (Ferguson et al., 1997, Bitsch et al., 2002). Auch im Cuprizone-Tiermodell, sowie in anderen Tiermodellen, korreliert die Anzahl der APP⁺ Sphäroide mit dem Ausmaß der inflammatorischen Läsionen (Lindner et al., 2009).

Sowohl in aktiven MS Läsionen (Witte et al., 2009), als auch in Cuprizone-induzierten Läsionen von Versuchstieren in der weißen Substanz (Ohno et al., 2014), ist die Dichte an Mitochondrien in demyelinisierten Axonen erhöht. Diese und weitere Parallelen machen das Cuprizone-Modell zu einem wichtigen Tiermodell in der heutigen MS-Forschung.

3 Fragestellung

Neurodegeneration, im Speziellen Neuronenverlust sowie axonaler Schaden, trägt maßgeblich zur Krankheitsprogression der MS bei. Aus diesem Grund beschäftige ich mich im Rahmen meiner Doktorarbeit mit diesen wichtigen Aspekten.

Im Kortex von MS Patienten bzw. deren post-mortem Präparaten zeigten Clements et al., (2008) einen Verlust an PV⁺ Interneuronen. Um besser zu verstehen welche Faktoren zu diesem Verlust bei MS Patienten führen, werden Tiermodelle benötigt. Da ein Tiermodell nicht alle Aspekte der MS abdecken kann, muss anfänglich geklärt werden, welche pathologischen Merkmale der Erkrankung das Tiermodell abbildet.

In einem experimentellen Mausmodell (EAE) wurde bereits festgestellt, dass es zu einer Verminderung der PV⁺ Interneurone im Kortex kommt (Falco et al., 2014). Im Cuprizone-Tiermodell wurde der Verlust an Neuronen im Hilus des Gyrus Dentatus sowie der Verlust von PV⁺ inhibitorischen Interneuronen im Hippocampus CA1 beschrieben (Hoffmann et al., 2008; Lapato et al., 2017). Jedoch ist bislang nicht klar, ob auch andere Gehirnregionen, wie z. B. der Kortex Cuprizone-behandelter Mäuse von Neuronen-Verlust betroffen sind.

Diese Studie soll einen Beitrag zur Validierung des Cuprizone-Modells, im Speziellen hinsichtlich des Verlusts von PV⁺ Interneuronen im Kortex, liefern. Es stellt sich die Frage, ob dieser Aspekt der Neurodegeneration am Cuprizone-Tiermodell weiter erforscht werden kann, damit langfristig Behandlungsstrategien für MS-Patienten entwickelt werden können.

Meine Doktorarbeit beschäftigt sich zudem mit neuronalem, axonalem Schaden, einem weiteren wichtigen Aspekt der Neurodegeneration. Ein intakter vesikulärer Transport ist lebenswichtig für die Integrität des Axons. Bei MS Patienten bzw. deren post-mortem Präparaten konnte festgestellt werden, dass es im Verlauf der Erkrankung zu axonalem Schaden kommt. Dieser kann mittels APP, einem verbreiteten Marker, immunhistochemisch als Sphäroide dargestellt werden (Ferguson et al., 1997, Gudi et al., 2017). Hoflich et al. konnten auch im Cuprizone-Maus-Modell Akkumulationen von APP nachweisen (2016). Ohno und Kollegen konnten mittels Elektronenmikroskopie in demyelinisierten Axonen Auftreibungen mit dicht gepackten Zellorganellen darstellen (2014). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Axonen können jedoch nicht Auskunft über die individuellen Vesikel und deren Inhalte geben. Die IHC wird benötigt, um die akkumulierten Vesikel und Zellorganellen auf biochemischer Ebene zu charakterisieren (Rühling et al., 2019). In welchem Ausmaß Mitochondrien an axonalen Transportdefiziten beteiligt sind, ist bislang noch unklar.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit möchte ich anhand des Cuprizone-Modells herausfinden, ob mitochondriale Proteine durch den geschädigten axonalen Transport beeinträchtigt werden und dadurch akkumulieren. Ferner möchte ich der Frage nachgehen, ob Mitochondrien oder Bestandteile von Mitochondrien in direktem Zusammenhang mit axonalem Schaden stehen.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien / Materialien für die Perfusion, Einbettung und Schnittherstellung

Material / Chemikalien	Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
B.Braun Omnifix® Luer	Spritze 20ml	Braun, Mainz Deutschland	4616200F
B.Braun Omnifix® Luer	Spritze 50ml	Braun, Mainz Deutschland	22050
Bechergläser	1000ml	VWR, Darmstadt Deutschland	213-1111
Bienenwachs	gelb: rein natürlich	Roth, Karlsruhe Deutschland	5830.1
Chloralhydrat	C2H3Cl3O2, ≥99,5 %, Ph.Eur., BP, USP, Trichloroacetaldehydhydrat	Roth, Karlsruhe Deutschland	K318.1
Dinatriumhydrogenphosphat	Na2HPO4	Merck, Darmstadt Deutschland	1.06580.1000
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland	03685
Einbettautomat	Leica ASP 200s-Paraffin-Einbettautomat		
Einbettkästchen mit Deckel	Megakassetten, weiß	Medite, Burgdorf Deutschland	47-1150-00
Einbettkästchen ohne Deckel		VWR, Darmstadt Deutschland	1387-4901
Ethanol		Merck, Darmstadt Deutschland	1.00983.
Falcon-Röhrchen	Rotilabo®-Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit Beschriftungsfeld	Roth, Karlsruhe Deutschland	N463.1
Filterpapier	Ø240mm	Schleicher & Schuell, Düren Deutschland	594 1/2
Formaldehyd	37%	Roth, Karlsruhe Deutschland	CP10.2
Nadeln	27Gx 3/4; 0,4x20mm	Terumo, Eschborn Deutschland	NN-2719R
Natriumdihydrogenphosphat	NaH2PO4	Merck, Darmstadt Deutschland	1.06346.1000
Natronlauge	NaOH 1 mol/l	Roth, Karlsruhe Deutschland	K021.1
Objektträger	SuperFrost® Plus	VWR, Darmstadt Deutschland	631-0108
OP-Besteck	Schere, Pinzetten, Stecknadeln		
Paraffin		Merck, Darmstadt Deutschland	K46815058603
Paraplast		Leica, Richmond, IL	39602012
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PBS-Pulver ohne Ca2+/Mg2+	Merck (Biochrom), Darmstadt Deutschland	L-182-50
Safety- Multifly-Kanüle	20G 200mm lang	Sarstedt, Nümbrecht Deutschland	85.1637.235
Schlittenmikrotome		Leica Biosystems	SM200R
Schnittmikrotom		Leica Biosystems	SM200R
Schottflaschen	1000ml, Enghalsflasche mit Schraubverschluss	VWR, Darmstadt Deutschland	215-1557
Schottflaschen	2000ml Enghalsflasche mit Schraubverschluss	VWR, Darmstadt Deutschland	215-1558
Spritze	1ml	Henke- SASS Wolf GmbH, Tuttlingen Deutschland	
Trichter	Ø250mm	VWR, Darmstadt Deutschland	221-1730
Wasserbad		Leica Biosystems	HI1210
Xylol	isomerisch. Analar normapur ACS, ISO	VWR, Darmstadt Deutschland	28975.462

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

4.2 Chemikalien und Materialien, für die IHC / Immunfluoreszenz

Material/ Chemikalien	Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
ABC-Kit	Avidin/HRP- Kopplung, Vectastain Elite Kit	Linaris Vector, Biologische Produkte GmbH, Dossenheim Deutschland	PK-6100
Bovines Serumalbumin	BSA (Stabilzier)	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland	A-2153
Citrat		Roth, Karlsruhe Deutschland	X863.2
Cold Fish Skin/Gelatine		Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland	G-7041
DAB-Substrat		Dako, Glostrup Dänemark	K3468
DAB Diaminobenzidine	DAB	Dako, Glostrup Dänemark	K3468
DAPI	Bisbenzimid H33258	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland	14530
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland	03685
Eppendorf Pipetten			
Eppendorf Spitzen	0,1-20µl	VWR, Darmstadt Deutschland	022492012
Eppendorf Spitzen	2-200µl	VWR, Darmstadt Deutschland	0030000870
Eppendorf Spitzen	50-1000µl	VWR, Darmstadt Deutschland	0030000919
Eppendorf Tubes (Eppi's)	1,5 ml Eppendorf	VWR, Darmstadt Deutschland	0030120.086
Eppendorf Tubes (Eppi's)	2,0 ml Eppendorf	VWR, Darmstadt Deutschland	0030120.094
Ethanol	EtOH	Merck, Darmstadt Deutschland	1.00983.
FluorPreserve Reagent	FluorPreserve	Sigma-Aldrich (Calbiochem), Steinheim Deutschland	345787
Kaisers Glyceringelatine		Merck, Darmstadt Deutschland	1.092.42.0100
Natronlauge bzw. Natriumhydroxid	NaOH 1mol/l	Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland	041284
Normales Ziegen Serum		Vector	S-1000
Normales Esel Serum		Sigma	D99663
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS-Pulver ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Merck (Biochrom), Darmstadt Deutschland	L-182-50
Tris (Pufferan®)		Roth, Karlsruhe Deutschland	4855.2
Tween 20	(detergent and surface tension reducer)	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland	P-1379
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂ 30%	Roth, Karlsruhe Deutschland	8070.4
Xylol	isomerisch. Analar normapur ACS, ISO	VWR, Darmstadt Deutschland	28975.462

Tabelle 2: Chemikalien und Materialien, für die IHC / Immunfluoreszenz

4.3 Übersicht der Versuche

Um den Verlust von PV⁺ Interneuronen zu untersuchen, wurden 9 Tiere fünf Wochen lang mit Cuprizone-haltigem Futter intoxiciert. Fünf Tiere erhielten normales Futter. Die Mäuse wurden nach Tötung transkardial perfundiert und postfixiert (siehe Kapitel Transkardiale Perfusion). Es wurden 10-11 Gehirn-Schnitte pro Tier angefertigt, diese gegen PV gefärbt und die Interneurone mit dem Programm Stereoinvestigator quantifiziert. Hierfür wurde zunächst der Untersuchungsbereich, hier der Kortex, definiert und die PV⁺ Interneurone stereologisch ausgewertet.

Um das Ausmaß der mitochondrialen Proteine an axonalen Transportdefiziten zu untersuchen, wurden 19 Mäuse analysiert. Davon erhielten je fünf Tiere eine, drei oder fünf Wochen lang Cuprizone-

haltiges Futter. Die vier Kontrolltiere erhielten normales Futter. Daraufhin erfolgten die immunhistochemischen Färbungen. Die gefärbten Schnitte wurden entweder mit einem Nikon Eclipse 50i oder mit einem Olympus BX50 Mikroskop ausgewertet. Das mittlere CC inklusive Cingulum (ROI) wurde auf Höhe R265 nach dem online Maus brain atlas (<http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>) ausgewertet.

4.4 Versuchstiere

Für die Durchführung der Versuche wurden 8 Wochen alte männliche Mäuse (19-21 g) des Stamms C57BL/6J (Janvier, Frankreich) verwendet. Die Versuchstiere wurden mit 0,25 % Cuprizone-haltigem Futter intoxiziert. Das Futter wurde alle 2 Tage neu zubereitet und das vorgemischte Futter über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Kontrollgruppe erhielt Normalfutter. Die Tiere wurden nach standardisierten Laborbedingungen gemäß der Organisation „Federation of European Laboratory Animal Science Association's (felasa)“ in gut belüfteten Käfigen bei einer Luftfeuchtigkeit von 55% ± 10% bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden und einer Raumtemperatur von 23 °C ± 2°C gehalten. Jeder Käfig war mit Einstreu, Mäusehäuschen, Nestlet, 100 g des jeweiligen Futters (verteilt auf 2 getrennte Petrischalen mit jeweils 50 g) und einer Trinkflasche ausgestattet. Die Tiere hatten durchgehend Zugang zu Futter und Trinkwasser. Es wurden die aktuell geltenden Tierschutzbestimmungen eingehalten und eine Genehmigung für die Durchführung der Tierversuche gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) lag durch die Regierung von Oberbayern vor (Tierversuchsgenehmigung 55.2-154-2532-73-15).

Transkardiale Perfusion

Perfusionslösung:

150ml Perfusionslösung + 50 ml für post-Fixierung für jedes Tier
 Formaldehyde (37 %) 100 ml
 Bi-dist Wasser 900 ml
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4,6 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 8,0 g
 pH: 7,4

Paraffineinbettung:

1. Aufsteigende Alkoholreihe: je 40 min in 2 mal in 70% Ethanol, 3 mal in 96% Ethanol 1 mal in 100% Ethanol
2. je 60 min in 2 mal in 100% Ethanol
3. je 40 min in 3 mal in Xylol
4. je 60 min in 2 mal in Paraffin
5. 2 Tage in Paraffin

Zur tiefen Narkose wurde den Tieren intraperitoneal eine Ketamin-Xylazin-Lösung intraperitoneal verabreicht. Anschließend erfolgte die Tötung der Tiere und eine transkardiale Perfusion mit einer 3,7% Formaldehydlösung. Dabei wurde dem zuvor betäubten Versuchstier durch den linken Ventrikel 20 ml eiskaltem PBS und 2 x 50 ml eiskalter Perfusionslösung injiziert. Daraufhin wurde die Haut im Bereich der Schädelkalotte entfernt, diese durch einen sagittalen Schnitt eröffnet und das Gehirn vorsichtig heraus präpariert. Die entnommenen Proben wurden über Nacht mittels Perfusionslösung bei 4 °C postfixiert und dann am nächsten Tag je nach Versuch weiterverarbeitet.

Um die PV⁺ Interneuronen zu untersuchen, wurden die Gehirne anschließend mit einer aufsteigenden Sucroslösung (10%, 20%, 30%) kryoprotectiert und mittels -70 °C kaltem Isopentan in TissueTek Lösung eingefroren. Mit einem Kryo-Mikrotom wurden die Gehirne seriell in 40 µm dicke Schnitte geschnitten.

Um den axonalen mitochondrialen Schaden zu analysieren, wurden die Gehirne am nächsten Tag für 12 Stunden in Leitungswasser gewässert. Es folgte das Inkubieren der Versuchsproben in 50% Ethanol mit anschließender manueller Dehydratation und Einbettung in Paraffinblöcke.

Paraffineinbettung: Die Gehirne für die Paraffineinbettung wurden jeweils in Einbettkassetten gegeben und in Leitungswasser gespült. Die weiteren Schritte sind der Aufzählung weiter oben zu entnehmen.

Anschließend wurden die Gewebeproben in 5 μm dicke Paraffinschnitte mittels Schlittenmikrotom (*Leica, SM 2000R*) geschnitten. Zwei nebeneinanderliegende Schnitte wurden auf einem Objektträger aus dem warmen Wasserbad herausgelöst und daraufhin bei 37 °C über Nacht getrocknet.

4.5 Färbungen

AK	Verdünnung	Bestellnr.	Serum	Art	Hersteller	primärer AK
Anti Hase	1:500	BA1000	10 % NZS	Ziege, IgG biotinyliert	Vector	PV
Anti-Hase	1:200	BA1000	2 % NZS	Ziege, IgG biotinyliert	Vector	COXIV
Anti-Maus	1:200	BA9200	5 % NZS	Ziege-IgG biotinyliert	Vector	VDAC1, PLP, APP

Tabelle 3: Primäre AK

AK	Verdünnung	Bestellnr.	Serum	Art	Hersteller	Sekundärer AK
VDAC1	1:8000	Ab 14734	5 % NZS	Maus, monoclonal	abcam	Anti-Maus
APP	1:5000	MAB348	5 % NZS	Maus, monoclonal	Sigma-Aldrich	Anti-Maus
PLP	1:5000	MCA839G	5 % NZS	Maus, monoclonal	Serotec/Biorad	Anti-Maus
PV	1:2000	Ab11427	10% NZS	Hase polyclonal	abcam	Anti-Hase
COX IV	1:500	Ab20393	2% NZS	Hase, polyclonal	abcam	Anti-Hase

Tabelle 4: Sekundäre AK

4.5.1 Free Floating IHC in Kryo eingebettete Schnitte

PBS (10x Stammlösung)

477.75 g PBS-Pulver ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
5 L Aqua dest.

PBS (1x Gebrauchslösung)

500 ml PBS (10xStammlösung)
4500 ml Aqua dest.
pH 7.4

Waschlösung:

0.1% Triton X-100 (vol/vol), in 0.1M PBS PH 7,4

Endogene-Peroxidase blocking Lösung:

10% (vol/vol) Methanol, 0.3% (vol/vol) Hydrogenperoxid in 0.1M PBS

Serum blocking Lösung:

0.1% Triton X-100 (vol/vol), 10% Serum (vol/vol), in 0.1M PBS

Biotin-konjugierte sekundäre AK Lösung:

1:500 Dilution, 0.1% Triton X-100 (vol/vol), 10% Serum (vol/vol), in 0.1M PBS

Avidin/Biotin-Peroxidase Komplex Lösung:

250 μl Reagent A, 250 μl Reagent B (ABC Reagent-Kit), 25 ml of 0.1M PBS.

DAB Arbeitslösung:

500 µl DAB und 1 µl H₂O₂ (500:1)

Gelatine OT-Beschichtung

50 g gepulverte Gelatine auf 1 L Aqua dest. langsam erwärmen in 60 °C lösen. Nach Abkühlen 0,32 Chrom(III) –Kaliumsulfat-Dodecahydrat zugeben. Trocknen lassen, am nächsten Tag für 30 min. in 4,5 %ige Formaldehydlösung.

Methode:

Waschen: 3x15 min. Schnitt in Well mit 500 µl PBS/Well auf Schüttler waschen. Mit Pipette PBS bei jedem Schnitt absaugen, neues PBS mit Pipette in gleichen Well.

Peroxidase Block: Schnitt in 10 % Methanol, 0,3 % H₂O₂ in PBS für 1 h auf Schüttler im Dunkeln ca. 500 µl pro Well

1. Waschen: 2x15 min in 1xPBS siehe oben, 1x15 min in 1x PBS/0,1%Triton
2. Blocking: 10% NZS (1:10 Verhältnis) in PBS/0,1%Triton für 2 h bei Raumtemperatur auf Schüttler
3. Primärantikörper: PV, in NZS in PBS/0,1%Triton über Nacht (~12 h) bei 4 ° auf Schüttler inkubieren.
4. Waschen: 2x15 min in 1xPBS, 1x15 min in 1x PBS/0,1%Triton
5. Sekundärantikörper in NZS in PBS/0,1%Triton für 2 h bei Raumtemperatur
6. Waschen: 3x15 min in 1xPBS
7. Avidin/HRP-Biotin: halbe Stunde vor Gebrauch ansetzen, dunkel lagern, A und B je 1:50 in PBS für 2 h bei Raumtemperatur
8. Waschen: 3x15 min in 1xPBS
9. Visualisation: direkt vor Gebrauch ansetzen, für 10 min in DAB Arbeitslösung
10. Waschen: 2x15 min in Leitungswasser, 1x15 min in PBS
11. Eindecken:
 - a. Die Schnitte werden auf SuperFrost® Plus 0,5% Gelatine OT's aufgezogen (2 Pro OT).
 - b. Über Nacht trocknen lassen.
 - c. Kurz in Aqua dest. eintauchen.
 - d. Für jeweils 5 min in aufsteigende Alkoholreihe eintauchen 50%, 70%, 96%, 96%, 100%, 100%, 1:1 Xylol/Ethanol
 - e. Für jeweils 5 min in drei verschiedene Xylolbäder eintauchen.
 - f. DPX auf Deckgläschen geben und auf den OT sanft fallen lassen.
 - g. DPX verteilen, die Luftblasen wegdrücken und nach 60 min Gewichte draufstellen.

4.5.2 IHC in Paraffin eingebettete Schnitte**Citratpuffer:**

10,5 g Zitronensäure
5L Aqua dest.
pH 6.0

2 % Ziege Blocking Lösung (10 ml, pH 7.4)

Verdünnung 1:50 (Serum in PBS)
0,2 ml NZS
0,01g cold water fish skin gelatin

0,1 g BSA
50 µl Tween 20 10 %
9,8 ml PBS

DAB Arbeitslösung:

Verdünnung 1:50
28 µl DAB Stock
1372 µl DAB Substrat Puffer

Hämatoxylin Lösung:

1 g Hämatoxylin
1000 ml Aqua dest.
200 mg Natriumiodat
50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat
50 g Chloralhydrat
1 g Citronensäure Monohydrat

Methode:

1. Entparaffinierung durch Xylol und Rehydrierung durch absteigende Alkoholreihe:
 - a. Je 10 min in 3 mal Xylol
 - b. 5 min 1 mal in Xylol 50 % / Ethanol 50 %
 - c. je 3 min 2 mal in 100 % Ethanol , 2 mal in 96 % Ethanol, 1 mal in 70 % Ethanol, 1 mal in 50 % Ethanol und 1 mal in Aqua dest.
2. Demaskierung: Schnitte für 10 min in Mikrowelle in Citratpuffer (für APP in Tris EDTA) (pH 6,0) und Kochen (Demaskierung: „heat induced epitope retrieval“, „HIER-Methode“).
3. Abkühlung, Schnitte auf Raumtemperatur durch 15-min Umspülen der Küvette und Leitungswasser.
4. Waschen: 3x15 min Schnitt in Well mit 500 µl PBS/Well auf Schüttler waschen. Mit Pipette PBS bei jedem Schnitt absaugen, neues PBS mit Pipette in gleiches Well.
5. Blocking: Schnitt in 2 % Ziege „Blocking Lösung“eine Stunde bei Raumtemperatur. Schnitte nur abklopfen.
6. Primärantikörper in NZS in PBS über Nacht (~12 h) in einer feuchten Kammer bei 4 °auf Schüttler.
7. Waschen: 3 x 15 min PBS
8. Peroxidaseblock: in 0.3 % H₂O₂ (30 % H₂O₂ 1:100) in PBS für 30 min. Vor Licht schützen.
9. Waschen: 3 x 15 min in PBS
10. Sekundärantikörper in NZS in PBS für 1 h bei Raumtemperatur.
11. Waschen: 3 x 15 min in PBS
12. Avidin/HRP-Biotin: 30 min vor Gebrauch ansetzen, Dunkel lagern, A und B je 1:50 in PBS für 1 Stunde in feuchter Kammer bei Raumtemperatur.
13. Waschen: 3 x 15 min in PBS
14. Visualisation: direkt vor Gebrauch ansetzen: für 10 min in DAB Arbeitslösung (1:50).
15. Waschen: Sekunden in Leitungswasser, 5 min in PBS.
16. Hämatoxylin-Gegenfärbung: Schnitte für 15 Sekunden im Hämalaun-Bad.
17. Bläuen: 10 min unter fließendem Leitungswasser
18. Waschen: 3 x 15 min in PBS.
19. Dehydratation:
 - a. 3 min in je 1 x Aqua dest. 1 x 50% Ethanol 1 x 70% Ethanol 1 x 96% Ethanol 1x 96% Ethanol 2 x 100% Ethanol
 - b. 5 min in 1 x Xylol 50% / Ethanol 50%

- c. 10 min in 3 x Xylol
- 20. Eindecken:
 - a. DPX auf Deckgläschen und OT sanft fallen lassen.
 - b. DPX verteilen, sanft Luftblasen wegdrücken und nach 60 min Gewichte draufstellen. Unter Abzug über Nacht trocknen.

4.5.3 Immunfluoreszenz Doppelfärbung APP & VDAC1

2% Esel Blocking Lösung:

(Aliquots bei -20°C)

Verdünnung 1:50 Serum in PBS

1 ml NES

0,05 g Cold Water Fish Skin Gelatine

0,5 g BSA

250 µl Tween20 10 %

49 ml PBS

DAPI Arbeitslösung:

DAPI Stock A (dunkel lagern)

10 mg DAPI

1 ml Aqua dest.

DAPI Stock B (dunkel lagern)

Verdünnung 1:1000

1 µl DAPI Stock A

1 ml Aqua dest.

DAPI Arbeitslösung:

Verdünnung 1:10 (von Stock B insg:1:10.000)

50 µl DAPI von Stock B

450 µl Wasser

Tris-EDTA-Puffer:

6,05 g Tris

1,85 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat

l Aqua dest.

pH 9.0

5 % NES/Triton/PBS

Verdünnung 1:20

2,5 ml NES

47,5 ml 0,5 % Triton/PBS (Verdünnung 1:200 5ml Triton X-100 und 995 ml PBS)

Methode:

1. Entparaffinierung durch Xylol und Rehydrierung durch absteigende Alkoholreihe, siehe oben
2. Demaskierung: Schnitte für 10 min in Mikrowelle in Tris/EDTA Puffer (pH 9,0) zum Kochen bringen (Demaskierung durch „heat induced epitope retrieval“; „HIER-Methode“)
3. Abkühlung der Schnitte auf Raumtemperatur durch 15-min Umspülen der Küvette mit Leitungswasser
4. Waschen: 3 x 15 min in PBS
5. Blocking: Schnitt in 2 % Esel Blocking Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Schnitte nur abklopfen.
6. Primärantikörper doppelt:
 - a. APP millipore MAB 348, Maus, monoclonal 1:2500

- b. COXIV abcam 160556 Hase, polyclonal 1:8000
7. In 2 % „Esel blocking Lösung“ über Nacht (~12 h) in einer feuchten Kammer bei 4 ° auf Schüttler inkubieren.
8. Waschen: 3 x 15 min in PBS
9. Sekundärantikörper doppelt:
 - a. Esel α – Maus 488
 - b. Esel anti-Hase 594
10. 1:100 in 5 % NES/Triton/PBS für 1,5 h bei Raumtemperatur.
11. Waschen: 3 x 15 min in PBS
12. DAPI Gegenfärbung (->DNA): für 5 min in DAPI Arbeitslösung (1:10 DAPI Stock B) in Aqua dest. bei Raumtemperatur in feuchte Kammer.
13. Waschen: 2 x 5 min in Aqua dest.
14. Eindecken: in FlourPreserve bei 4 ° C lagern

4.6 Auswertung

4.6.1 Stereologie

Die Stereologie ist die Methode der Wahl, quantitativ die Anzahl von Zellen in einer Körperregion zu bestimmen. Für die Quantifizierung ist weder die Größe und Lage der zu untersuchenden Zellen noch deren Form ausschlaggebend (vgl. z.B. Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006). Die Stereologie liefert eine mikroskopisch gestützte Schätzung in einem genau definierten Bereich (ROI=region of interest, hier Kortex) eines Gewebes. Wiederholt man die Schätzung unendlich oft, würde diese dem arithmetischen Mittelwert der genauen Zellzahl des zu untersuchenden Gewebes entsprechen. Hierfür werden vor allem dickere histologische Schnitte angefertigt (hier 40 μ m), da sich in dünnen Gewebeschnitten (5 μ m) meist nur Teile einer Zelle befinden. Dies kann durch Volumenzunahme einer Zelle oder Zellschrumpfung zu einer erhöhten oder verminderten mathematischen Wahrscheinlichkeit des Aufscheinens einer Zelle im dünnen histologischen Gewebeschnitt führen.

Bei herkömmlichen histologischen Auswertungsmethoden können neben Zellmorphologie oder Färbintensität „nur“ Zelldichten bestimmt werden. Hinzu kommt, dass sowohl die räumliche Ausrichtung der Zellen, sowie das Gesamtvolumen eines Organs das Zählergebnis beeinflussen können. Kommt es beispielsweise zu einer Volumenzunahme, rücken die Zellen bei gleichbleibender Zellzahl weiter auseinander. Dies verringert die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen in einem zweidimensionalen Gewebeschnitt angeschnitten werden. Bei einer Atrophie eines Organes würde man fälschlicherweise auf eine Zunahme der Zellzahl schließen. Am genauesten und zeitaufwändigsten wäre es, das komplette Gewebe histologisch aufzuarbeiten und jede Zelle einzeln zu zählen. Dabei müsste man achtgeben, dass wirklich jede Zelle nur ein einziges Mal gezählt wird. Nur so kann verhindert werden, dass weder Zellgröße noch Gewebsatrophie das Endergebnis verfälschen. Dies wäre äußerst kompliziert und würde einen immensen Zeitaufwand bedeuten.

Systematic und Random Sampling

In der Stereologie wird nur jeder x-te Schnitt (hier jeder 6.) untersucht und die Gesamtzellzahl in einem Gewebe hochgerechnet. Ausschließlich an Stellen gehäuftem Zellvorkommens zu zählen und das Ergebnis auf das gesamte Gewebe hochzurechnen würde ein viel zu hohes Endergebnis liefern (das Ergebnis wäre „biased“). An Stellen mit wenig oder gar keinen Zellen zu zählen hingegen würde die daraus hochgerechnete Gesamtzahl wesentlich niedriger (im Vergleich zur tatsächlichen Gesamtzahl von Zellen im Gewebe) ausfallen lassen - das Ergebnis wäre wiederum „verfälscht“. Um der unterschiedlichen Zellverteilung im Gewebe bei möglichst geringem Arbeitsaufwand gerecht zu werden, erfolgt die Zählung der Zellen in Gewebestichproben, die systematisch (hier jeder 6. Schnitt) und gleichzeitig zufällig über das gesamte Gewebe verteilt gewonnen werden (Prinzip des sogenannten „systematic and random sampling“, SRS). Der erste Schnitt wird zufällig bestimmt (random), jedoch der Abstand (hier jeder 6. Schnitt) wird systematisch festgelegt. Zudem werden nur bestimmte Bereiche des Schnittes untersucht. Dabei wird ein gleichmäßiges Gitter über die gesamte Oberfläche der

Schnitte gelegt. Hierfür wird auch das SRS Prinzip angewendet. Auf Grund des gleichmäßigen Gitterlinienabstandes in X- und Y-Richtung erfolgt eine systematische Positionierung (systematic), wegen der zufälligen Positionierung des Gitters auf der Oberfläche des Schnittes erfolgt sie zufällig (random).

Nun wird in jedem einzelnen Gitterquadrat ein Bereich festgelegt, der sogenannte zufällige Zählrahmen (engl. Unibased counting frame). Dieser zweidimensionale Raum wird während der Zellzählung um die Dicke des Schnittes (hier $40\ \mu\text{m}$) erweitert. Dadurch entsteht ein dreidimensionaler quadratförmiger Raum der sogenannte zufällige virtuelle Zählbereich (engl. Unibased virtual counting space). Dieser Bereich liegt immer an derselben Stelle jedes Gitterquadranten und stellt den definitiven Zählbereich dar. Beim Zählen der Zellen wird mittels Mikroskop durch die gesamte Schnittdicke durch fokussiert. Dabei wird der Schnitt optisch geschnitten. Es entsteht ein optischer Dissektor.

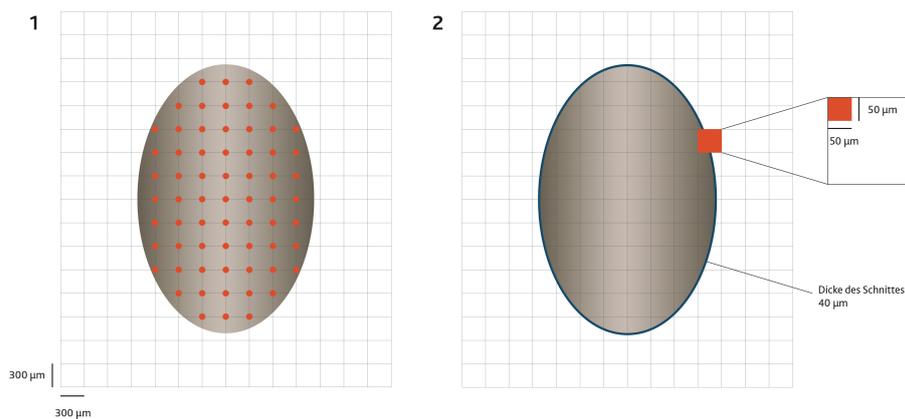


Abbildung 1: Zufällige Platzierung eines gleichmäßigen Rasters auf das zu untersuchende Gewebe. Rote Punkte stellen Überlappung der Raster-Schnittpunkte mit dem Schnitt dar. Durch den gleichmäßigen Abstand der X- und Y Achse sind sie systematisch und aufgrund der zufälligen Positionierung des Rasters gleichzeitig auch willkürlich (random). 2) Festlegung des Zählbereichs innerhalb eines Rasterquadrates. Dieser wiederholt sich in jedem Rasterquadrat an der gleichen Stelle (angelehnt an Laubner et al., 2018).

Festlegen der ROI

Um die ROI zu bestimmen, wurde der komplette Schnitt einmal mit der Tracer Funktion des Programmes Stereoinvestigator umrandet. Anschließend wurde durch das Programm der Mittelpunkt der umfahrenden Region festgelegt. Auf diesen Mittelpunkt wurde eine Horizontale gelegt. Der umrandete Bereich, der den Kortex (motorisch und sensorisch) umfasst, dient als ROI. Dieser wurde dann nochmals umfahren, um den definitiven Zählbereich festzulegen (Abbildung 2).

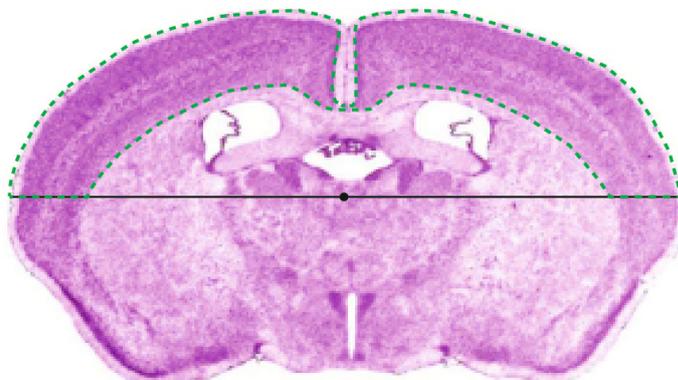


Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Festlegung der ROI

Definition der Sicherheitszonen

Histologische Schnitte können gegebenenfalls eine unebene Schnittoberfläche aufweisen. Zudem können durch mechanische Schäden während der Bearbeitung an den Seiten- Schnittflächen Zellen verloren gehen. Aus diesem Grund werden ober- und unterhalb des Zählbereichs (optical dissector) Sicherheitsabstände zur Schnittoberfläche, sogenannte Sicherheitszonen, bestimmt. Befindet sich eine Zelle in der Sicherheitszone, wird sie nicht berücksichtigt. Im Rahmen der hier beschriebenen Experimente wurde eine obere Sicherheitszone von 4 μm und eine untere Sicherheitszone von 2 μm eingerichtet.

Definition eines Zählkriteriums

Durch das SRS-Prinzip hat jede Zelle die gleiche Wahrscheinlichkeit gezählt zu werden. Damit sie jedoch nur einmal berücksichtigt wird, legt man ein charakteristisches Kriterium der Zelle fest (hier: rechte obere Ecke der Zelle). Nur wenn dieses Kriterium im zufälligen virtuellen Zählbereich zu sehen ist und in den Fokus kommt, wird die Zelle berücksichtigt.

Definition von Einschluss- und Ausschlusslinien

Damit jede Zelle nur einem optischen Dissektor zugeordnet werden kann, wird der Zählbereich (das Gitter des zufälligen Zählrahmens) von roten Linien (Ausschlusslinien) und grünen Linien (Einschlusslinien) begrenzt. Berührt ein Zählkriterium eine rote Linie oder liegt es außerhalb des Zählrahmens, wird die Zelle nicht gezählt. Berührt aber ein fokussiertes Zählcharakteristikum eine grüne Linie oder liegt es innerhalb des Zählrahmens, wird die Zelle berücksichtigt. Nur bei Einhaltung dieser verschiedenen Prinzipien kann vertrauenswürdig auf die Gesamtzellzahl geschlossen werden.

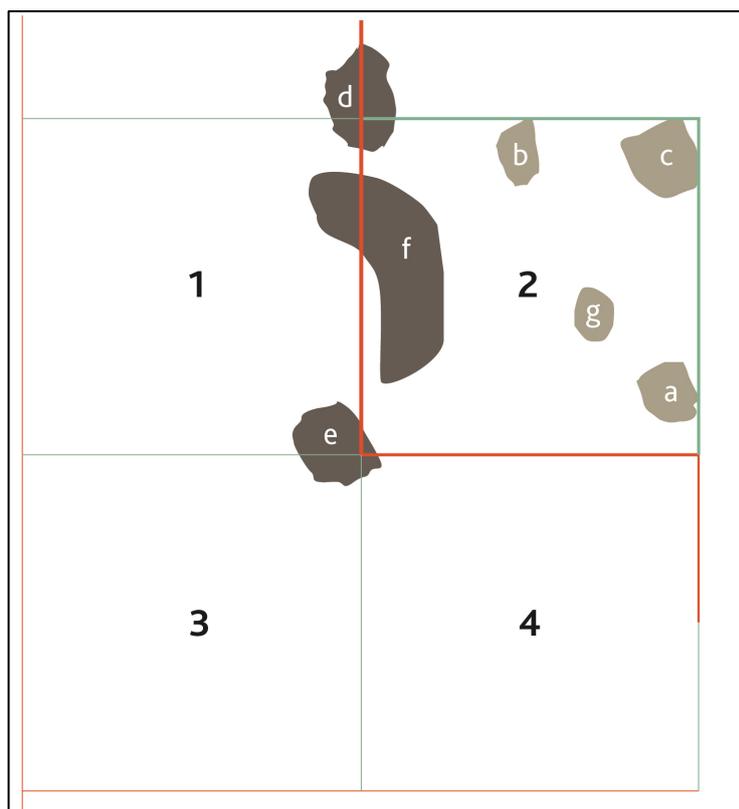


Abbildung 3: Zeigt vier zufällige virtuelle Zählbereiche. In Nummer zwei, dem aktiven zufälligen virtuellen Zählbereich, findet die Zählung statt. Die Ein- und Ausschlusslinien verhindern, dass eine Zelle mit ihrem charakteristischen Zählkriterium doppelt gezählt wird. Befindet sich das Zählkriterium (hier rechte oberste Ecke) innerhalb des Zählbereichs oder berührt eine grüne Linie wie Zellen a, b, c, g, werden die Zellen gezählt. Befindet sich das entsprechende Zählkriterium außerhalb des Zählbereichs oder auf einer roten Linie, wird die Zelle nicht berücksichtigt (d,f,e) (angelehnt an Laubner et al., 2018).

Bestimmung der Gesamtzellzahl

Um die Zellzahl aus den einzelnen ausgezählten Neuronenanzahlen zu errechnen, werden die ermittelten Daten in folgende Formel eingesetzt:

$$N_{\text{est}} = \sum n \times \sqrt[3]{(\text{ssf} \times \text{asf} \times \text{tsf})}$$

Die sogenannte section sampling fraction (ssf) errechnet sich aus dem Intervall der untersuchten Schnittserien (in meinem Versuch gilt $\text{ssf} = 1/6$).

Die sogenannte area sampling fraction (asf) errechnet sich als Quotient aus der Grundfläche der unbiased virtual counting spaces und der Größe des auf die untersuchten Schnitte aufgelegten Gitters (hier gilt $\text{asf} = \{50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} / 300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}\}$).

Die sogenannte thickness sampling fraction (tsf) errechnet sich als Quotient aus der Höhe der zufälligen virtuellen Zählbereiche und der mittleren gemessenen Dicke des Schnitts (hier gilt $\text{tsf} = 12\mu\text{m} / \text{gemessene Schnittdicke } \mu\text{m}$). Nest steht für die estimated number und Sigma für die Anzahl der gezählten Zellen in allen zufälligen virtuellen Zählbereichen (Kiessling, 2013).

Festgelegte Einstellungen für die Quantifizierung	
Intervall der Schnittserie	Jeder 6. Schnitt
Höhe des zufälligen virtuellen Zählbereichs	50 μm
Länge des zufälligen virtuellen Zählbereichs	50 μm
Dicke des Schnittes	40 μm
Gitterlinienabstand X	300 μm
Gitterlinienabstand Y	300 μm
Obere Sicherheitszone	4 μm
Untere Sicherheitszone	2 μm
Zählkriterium	Rechte obere Ecke der Zelle

Tabelle 5: Festgelegte Einstellungen für die Quantifizierung

4.6.2 Anti-VDAC1 und Anti-COXIV

Für die Quantifizierung der VDAC1⁺ und COXIV⁺ Sphäroide wurden von fünf ein, drei oder fünf Wochen intoxikierten -und vier Kontrolltieren je Tier zwei nebeneinanderliegende Schnitte der Region 265 nach dem Online Mouse Brain Atlas verwendet (veröffentlicht von Sidman et al. (<http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>)). Zuerst wurden Aufnahmen der zuvor immunhistochemisch gefärbten Schnitte, genauer des CC und Cingulums (ROI) mittels Nikon ECLIPSE E200 Mikroskop aufgenommen. Diese wurden mit Hilfe von Photoshop mittels Imagestiching zusammengefügt. Daraufhin erfolgte eine Randomisierung der zusammengefügten Schnitte. Nachdem das Bild kalibriert wurde, erfolgte eine Auswertung mit ImageJ (Version 1.47v, NIH, Bethesda, MD, USA). Dafür wurde die ROI umrandet, um die Fläche zu bestimmen und die darin liegenden Sphäroide manuell mittels der „Cell Counter“ Funktion gezählt. Die Sphäroide wurden nur gezählt, wenn sie nicht um einen Zellkern herum lokalisiert waren. Je Tier wurde aus den zwei Schnitten ein Mittelwert berechnet. Das Ergebnis wurde mit der Anzahl an Sphäroiden per mm² angegeben.

4.6.3 Anti-PLP

Um den Grad der Myelinisierung festzustellen, wurden die gegen PLP immunhistochemisch-gefärbten Schnitte in der Region 265 nach Online Mouse Brain Atlas ausgewählt. Es wurden von der ROI hier CC mittels Eclipse E200, Nikon installierten Kamerasystem (Digital sight DS-2Mv und DS-L2 Mikroskop Kontroll-Einheit, Nikon) Bilder angefertigt. Mit Hilfe von ImageJ (ImageJ Software 2.0.0. für Windows; Wayne Rasband, NIH, USA) wurde die Farbeintensität quantifiziert. Dafür wurde der Grad

der Myelinisierung in der ROI zwischen 100 und 0 gemessen. Ein Myelinisierungsgrad von 100 ist in einer unbehandelten Kontroll-Maus zu erwarten, wobei 0 eine total demyelinisierte Region darstellt.

Mit der „8bit“ Funktion von ImageJ wurde die ausgewählte, davor umrandete Region in ein Grau-Format umgewandelt. Es erfolgte die Umwandlung des Bildes von grau zu binär (schwarz-weiß Format). Mittels eines Thresholds (Schwelle) wurde die relative Dichte der ausgewählten Region gemessen. Die Dichtemessungen wurden nach Binärer Konversion des digitalisierten Bildes in Prozent der gesamten untersuchten Fläche angegeben. Die Vorbereitung sowie die Färbung dieser Schnitte erfolgten durch Uta Chrzanowski.

4.6.4 Anti-APP/Anti-COXIV Doppelfärbung

Für die Auswertung der APP/COXIV Doppelfärbung wurden fünf, drei oder fünf Wochen Cuprizone-intoxizierte Mäuse verwendet, sowie vier Kontrolltiere. Auch hier wurden je zwei nebeneinanderliegende Schnitte pro Tier ausgewählt. Die APP/COXIV Fluoreszenzdoppelfärbung wurde mittels Olympus BX50 Mikroskop analysiert. Die Schnitte wurden mit der DSU-Mikroskop Anlage (Olympus BX51-Wi fluorescence microscope station) digitalisiert, daraufhin verblindet und dann mittels Stereo Investigator Software (version 11, MBF Bioscience, Williston, VT, USA) ausgewertet. Dafür wurde für die ROI das CC ausgewählt. Es erfolgte die Zählung der APP⁺, COXIV⁺ und der doppelt positiven Sphäroide. Dabei wurde die Fläche nicht berücksichtigt. Die Daten wurden in COXIV⁺ und/oder APP⁺ Sphäroide angegeben.

4.7 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM = Standard Error of the Mean) dargestellt. Für die deskriptive Darstellung der Ergebnisse wurden fallweise Boxplots verwendet. In diesen wird der Median innerhalb der Box dargestellt, die 50 % der Daten repräsentiert. Die sogenannten Wiskers zeigen den gesamten Datenbereich. Der Nachweis statistisch signifikanter Unterschiede erfolgte durch einen t-Test. Ein Ergebnis wurde als statistisch Signifikant angesehen ab einem p Wert von 0,05. Bei Mehrfachtestungen wurde eine Bonferroni-Korrektur angewendet wobei sich das Signifikanzniveau auf (0,0167) verringerte.

5 Ergebnisse

5.1 Validierung des Cuprizone Modells: Cuprizone induziert Demyelinisierung im CC

Das Cuprizone-Modell dient der Erforschung neurodegenerativer, nichtautoimmunvermittelter Aspekte der MS. Im Bereich des CC wird durch die Fütterung mit Cuprizone eine toxisch induzierte Demyelinisierung ausgelöst. Um das Cuprizone-Modell für die weiteren Untersuchungen zu validieren, wurde eine immunhistochemische Färbung gegen das Myelinprotein PLP zur Darstellung der Myelinscheiden durchgeführt.

Diese zeigte bei Kontrolltieren eine fast homogene Färbung des CC (Abbildung 4), welche nach einwöchiger Intoxikation bereits etwas abnimmt und nach drei Wochen schon deutliche Zeichen der Demyelinisierung aufweist. Nach fünf Wochen ist das CC weitgehend demyelinisiert (Abbildung 4 D).

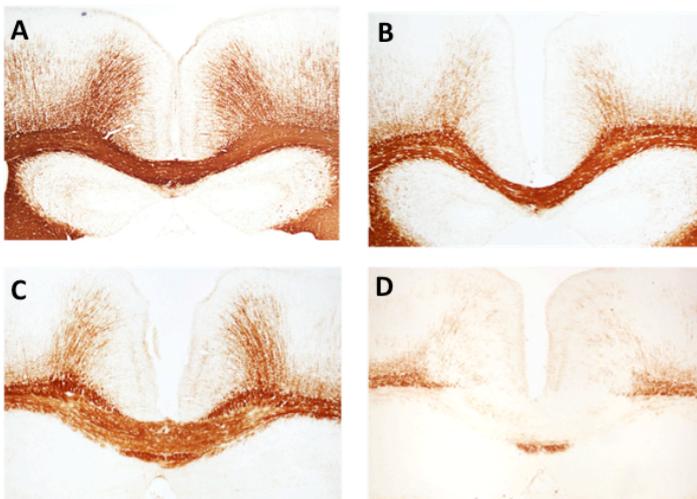


Abbildung 4: Cuprizone induzierte Demyelinisierung sichtbar gemacht durch eine anti-PLP Färbung des CC: Kontrolltiere (A), 1 Woche Cuprizone (B), 3 Wochen Cuprizone (C), 5 Wochen Cuprizone (D).

Die Dichte wurde mittels densitometrischer Messung bestimmt, um die Färbung quantitativ darzustellen. Diese zeigte eine weitgehend homogene Färbung der Myelinscheiden des CC bei den Kontrolltieren ($98,0\% \pm 3,7$). Nach einer Woche zeigte die anti-PLP Färbung keinen Verlust der Myelinscheiden ($94,6\% \pm 12,1$; $p = 0,0446$), nach drei Wochen einen geringen Verlust ($93,6\% \pm 10,0$; $p = 0,0074$). Nach fünf Wochen konnte ein hoch signifikanter Verlust festgestellt werden ($13,0\% \pm 4,4$; $p < 0,001$) (Abbildung 5).

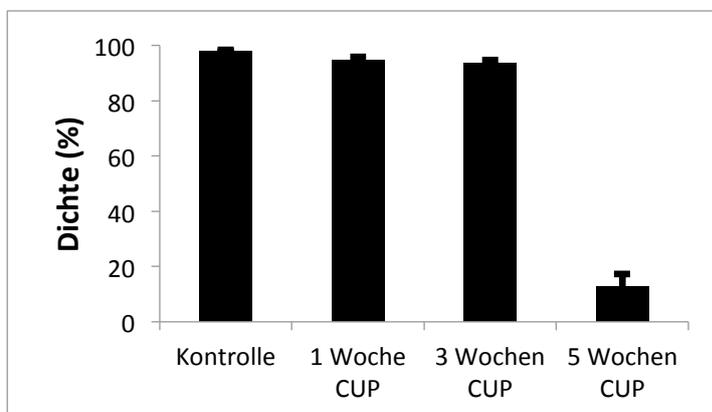


Abbildung 5: Die Quantifizierung des Myelinisierungsgrads im CC zeigt einen signifikanten Myelinverlust nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation

5.2 Cuprizone-Intoxikation führt zu keiner signifikanten Veränderung der PV⁺ Interneuronenzahl im Kortex

Ziel der Analysen ist die Quantifizierung von Interneuronen im Kortex, um einen potentiellen neuronalen Verlust als eine mögliche Komponente der Neurodegeneration zu testen. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrolle die Anzahl der PV⁺ Interneurone von durchschnittlich 330.954 (± 40.636) auf durchschnittlich 277.235 (± 30.545) abnimmt (Abbildung 6). Dies entspricht einer Reduktion von ca. 16 %. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (t-Test, $p=0,1579$). Zu berücksichtigen ist die geringe Stichprobenanzahl von vier Kontrolltieren und fünf Cuprizone-Tieren (

Abbildung 7). Abbildung 6 zeigt, dass sich die 50 % Quantilen nicht überlappen. Es ergibt sich insgesamt eine große Streuung der Werte.

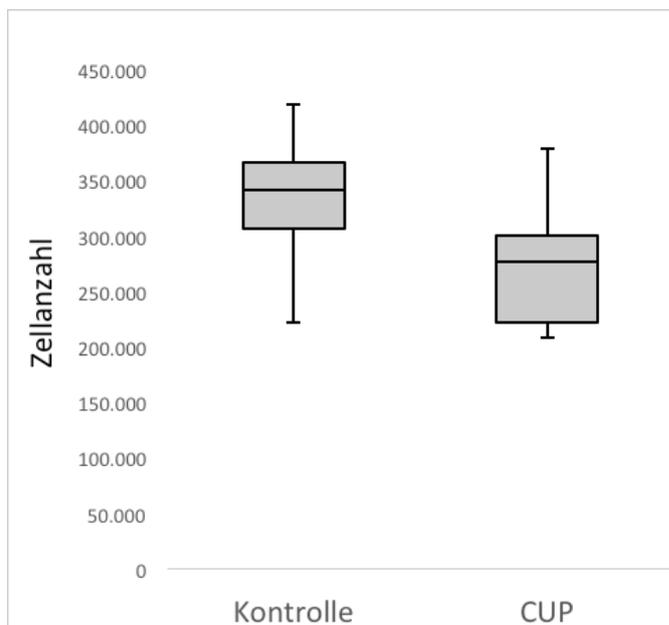


Abbildung 6: Vergleich der stereologisch ermittelten Anzahl der PV⁺ Interneurone im Kortex zwischen Kontrolltieren und fünf Wochen Cuprizone-intoxizierten Tieren

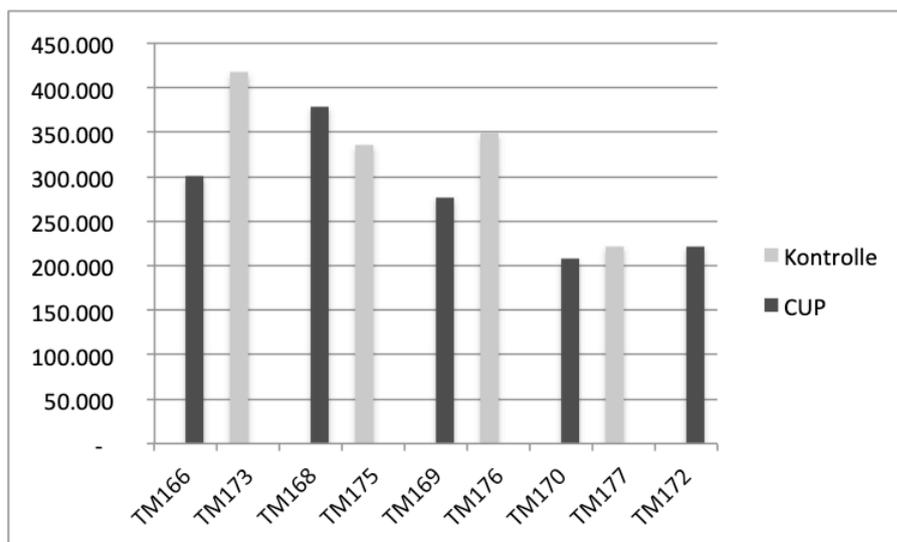


Abbildung 7: Quantifizierung der PV⁺ Interneurone der einzelnen Tiere.

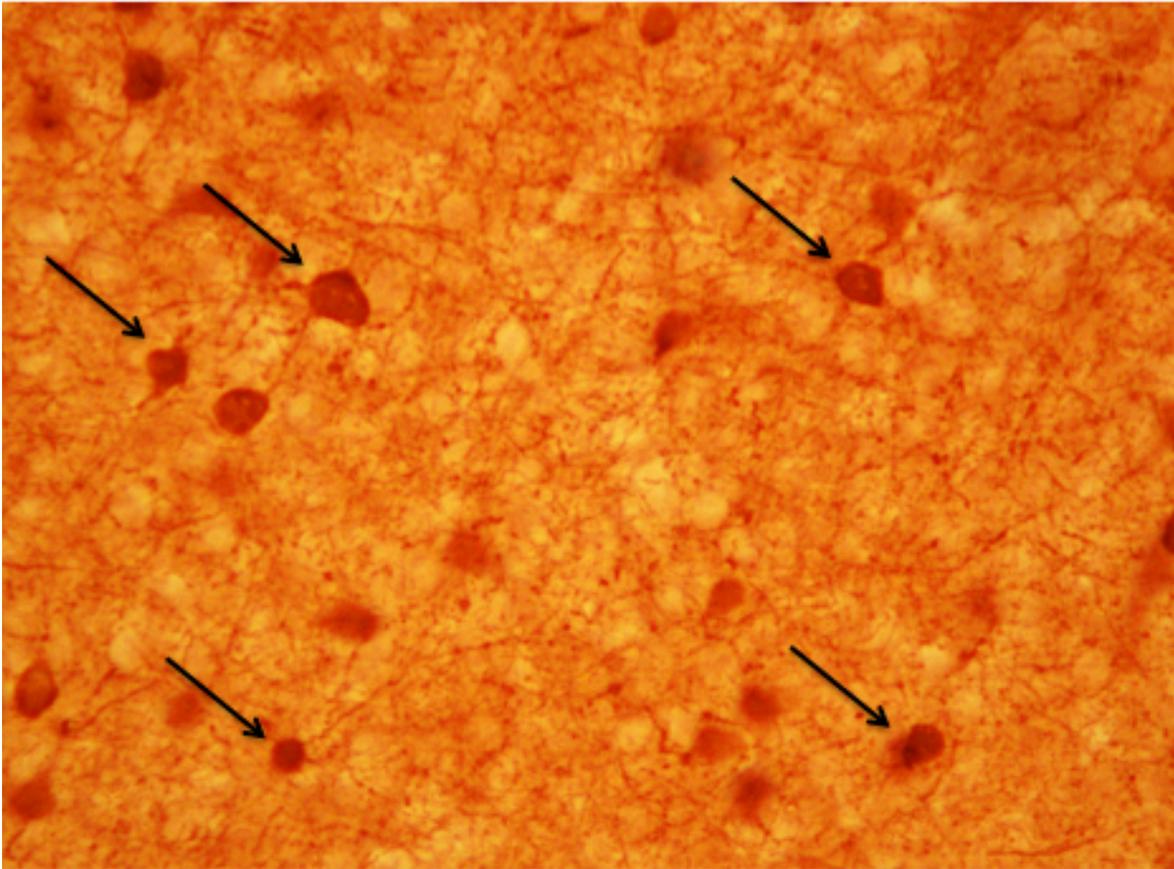


Abbildung 8: PV⁺ Interneurone (schwarze Pfeile) im Kortex eines Kontrolltieres

5.3 Cuprizone-Intoxikation führt zu akutem axonalem Schaden

Nachdem ich keinen signifikanten PV⁺ Zellkörperverlust feststellen konnte, stellte sich die Frage ob die Neurone anderweitig durch die Cuprizone Intoxikation geschädigt werden. Es wurde gezeigt, dass die Mehrheit des beeinträchtigten axonalen Transportes von Proteinen und Zellorganellen mit dem Ausmaß an inflammatorischer Demyelinisierung korreliert (Trapp et al., 1998, Gudi et al., 2017). Der beeinträchtigte axonale Transport kann durch eine immunhistochemische Färbung gegen APP sichtbar gemacht werden.

Auch meine Ergebnisse zeigen, dass im medialen CC (Abbildung 9 A) und Cingulums (Abbildung 9 B) von Kontrolltieren keine APP⁺ Sphäroide nachweisbar sind (Hoflich KM et al., 2016). APP⁺ Material wurde hauptsächlich in der grauen Substanz um die perinukleäre Region von Neuronen in Kontrolltieren entdeckt (Vergrößerung und Pfeil Abbildung 9 A). Auch ich konnte feststellen, dass APP⁺ Sphäroide nach fünf Wochen Cuprizone Behandlung (Abbildung 9 C+D, Vergrößerung und Pfeil) akkumulieren. APP⁺ Sphäroide (Pfeil in Abbildung 9 C), welche keinen örtlichen Bezug zu neuronalen Zellkörpern haben, wurden in demyelinisierten Läsionen des medialen CC (Abbildung 9 C) und des Cingulums (Abbildung 9 D) gefunden. Cuprizone Intoxikation induziert akuten axonalen Schaden, der durch anti-APP⁺ Sphäroide dargestellt werden kann.

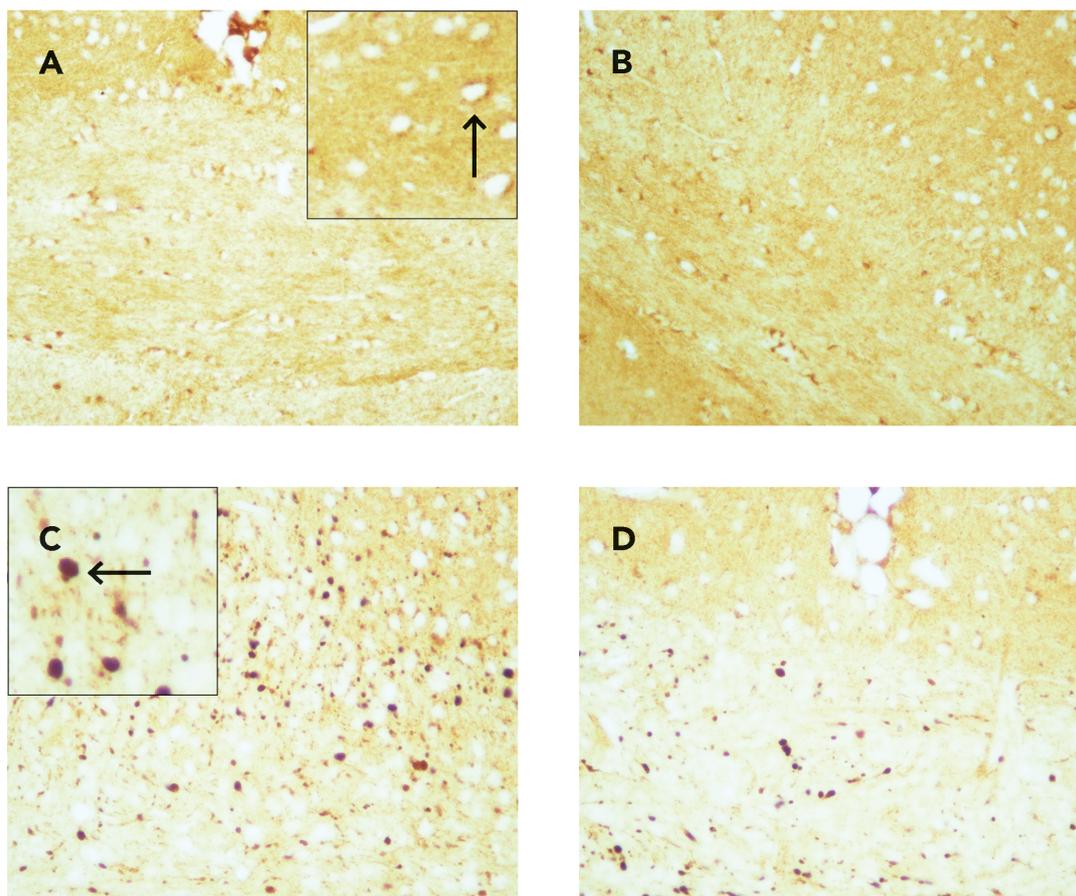


Abbildung 9: Anti-APP immunohistochemische Färbung. Gegenüberstellung von CC (A+B) und Cingulum (B+D) von Kontrolltieren (A+B) und fünf Wochen Cuprizone-intoxizierten Tieren (C+D).

5.3.1 Cuprizone-induzierte Demyelinisierung beeinflusst axonalen mitochondrialen Transport

Als nächsten Schritt wollte ich herausfinden, ob auch der Transport von Mitochondrien im Rahmen der Cuprizone-Intoxikation beeinträchtigt wird. Dafür erfolgten immunhistochemische-Färbungen mit mitochondrialen Markern gegen COXIV und VDAC1.

COXIV ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. COXIV⁺ Signale erscheinen als feine granuliert Punkte in der grauen Substanz (Abbildung 10). COXIV wurde besonders stark in der grauen Substanz, vor allem in räumlicher Nähe zu einem Zellkern, von Kontrolltieren exprimiert (Abbildung 10B, Vergrößerung, Pfeil). Hingegen war die weiße Substanz von Kontrolltieren frei von COXIV⁺ Signalen (Abbildung 10A, B). Nach einer Woche konnte noch keine Zunahme der Anzahl COXIV⁺ Sphäroide nachgewiesen werden. Bereits nach 3 Wochen Cuprizone-Intoxikation zeigte sich ein leicht signifikant erhöhtes Ergebnis der COXIV⁺ Sphäroide ($p=0,0143$). Nach fünf Wochen kam es zu einem hoch signifikanten Anstieg an COXIV⁺ Sphäroiden ($p<0,001$) (Abbildung 11). Die berücksichtigten Sphäroide (Abbildung 10D Pfeile) befanden sich nicht direkt in räumlicher Nähe zu einem Zellkern. Sphäroide in direkter räumlicher Nähe zu einem Zellkern wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt (Abbildung 10 C).

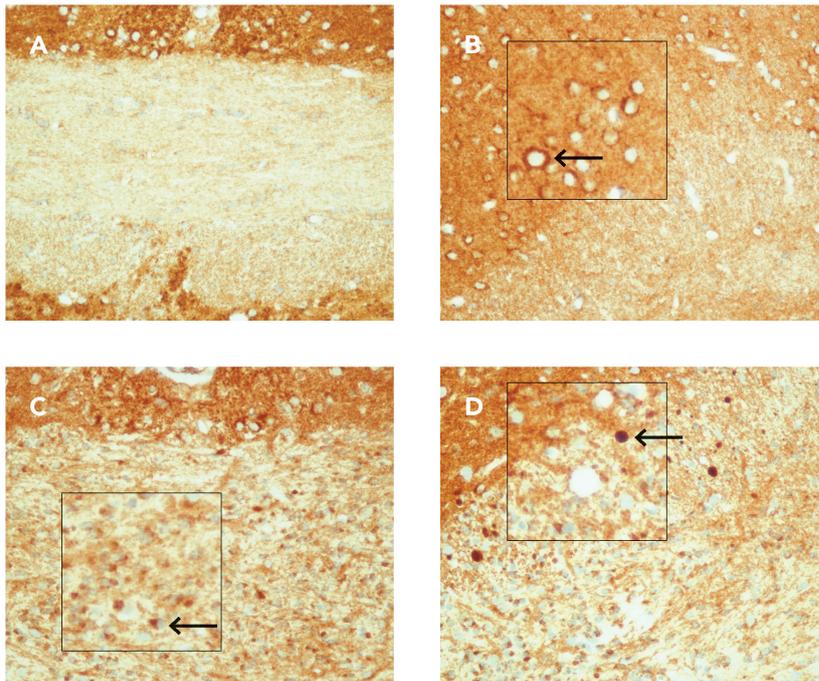


Abbildung 10: Teil des CC eines Kontrolltieres (Bild A). Perinukleares COXIV⁺ Material im Kortex eines Kontrolltieres (B Vergrößerung Pfeil). Gezählter Sphäroid (D Vergrößerung Pfeil) im Cingulum und nicht berücksichtigter perinuklearer Sphäroid (C Vergrößerung Pfeil) im CC von einem 5 Wochen Cuprizone behandelten Tier.

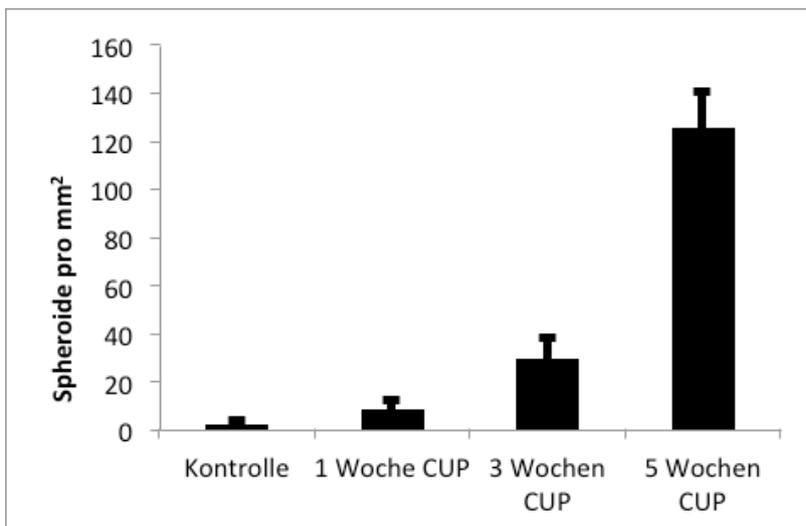


Abbildung 11: Vergleich der gezählten COXIV⁺ Sphäroide der 1, 3, 5 Wochen Cuprizone intoxikierten Tiere mit den Kontrolltieren.

VDAC1, auch bekannt als Mitochondrial Porin, ist ein Kanalprotein der äußeren mitochondrialen Membran. Nach einer Woche konnte noch keine Zunahme der Anzahl VDAC1⁺ Sphäroide nachgewiesen werden. Bei Woche 3 war das Zählergebnis für VDAC1⁺ Sphäroide ($p=0,0667$) nicht signifikant. Erst nach fünf Wochen kam es zu einem hoch signifikanten Anstieg ($p<0,001$) an VDAC1⁺ Sphäroiden (Abbildung 13).

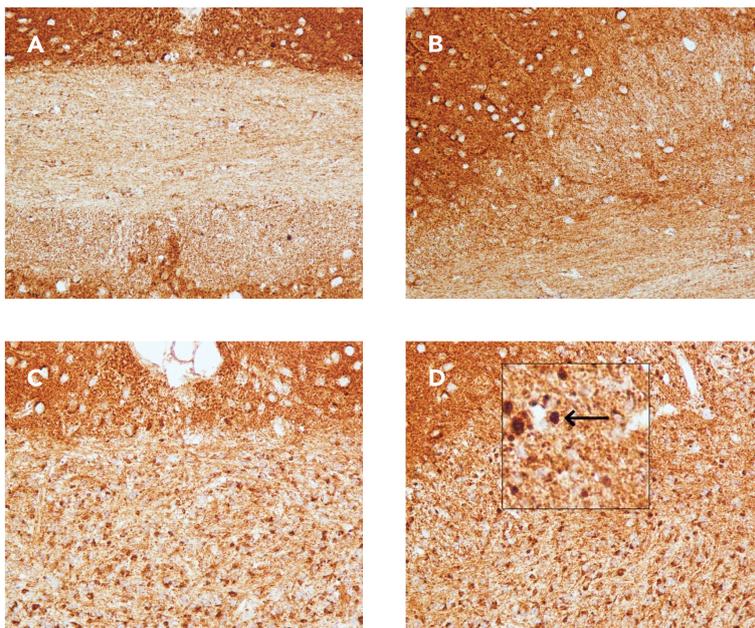


Abbildung 12: Keine VDAC1⁺ Sphäroide im CC (A) und Cingulum (B) von Kontrolltieren. VDAC1⁺ Sphäroide im CC (C) und Cingulum (D, Pfeil) von 5 Wochen Cuprizone-intoxizierten Tieren.

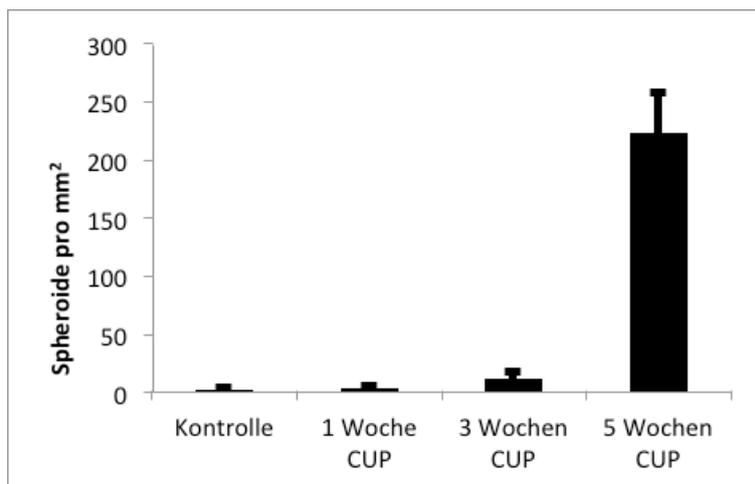


Abbildung 13: Vergleich der gezählten VDAC1⁺ Sphäroide der 1, 3, 5 Wochen Cuprizone-intoxizierten Tiere mit den Kontrolltieren.

5.3.2 Cuprizone-induzierte akute Demyelinisierung führt zu axonalen mitochondrialen als auch zu vesikulären Transportdefiziten

Um herauszufinden, ob sich Mitochondrien oder Teile von Mitochondrien in den akkumulierten Vesikeln befinden, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob Vesikelproteine und Mitochondrienbestandteile kolokalisieren. Dafür wurde eine Immun-fluoreszenz-Doppelfärbung gegen COXIV und APP angefertigt. Kolokalisierung von APP und COXIV wurde im CC von 5 Wochen Cuprizone-intoxizierten Tieren nach akuter Demyelinisierung festgestellt. Dabei gab es mehr COXIV⁺/APP⁻ Sphäroide (55,1 %) als COXIV⁻/APP⁺ Sphäroide (44,9 %). Nur ca. 20 % der Sphäroide waren COXIV⁺/APP⁺ (Abbildung 15). Abbildung 14 zeigt eine Kolokalisation von einem COXIV⁺/APP⁺ Sphäroid (Abbildung 14 A-C Pfeile). Die Pfeilspitze deutet auf einen rein COXIV⁺ Sphäroiden.

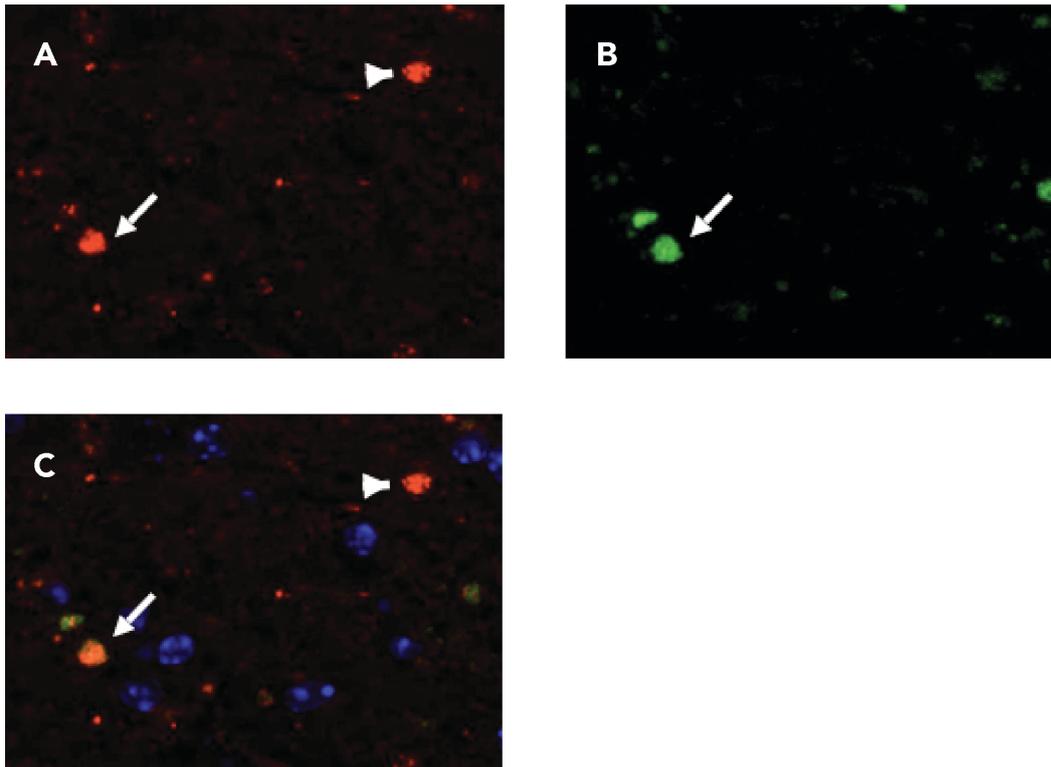


Abbildung 14: Immunfluoreszenz Doppelfärbung COXIV (rot) und APP (grün) von 5 Wochen Cuprizone-intoxizierten Tieren.

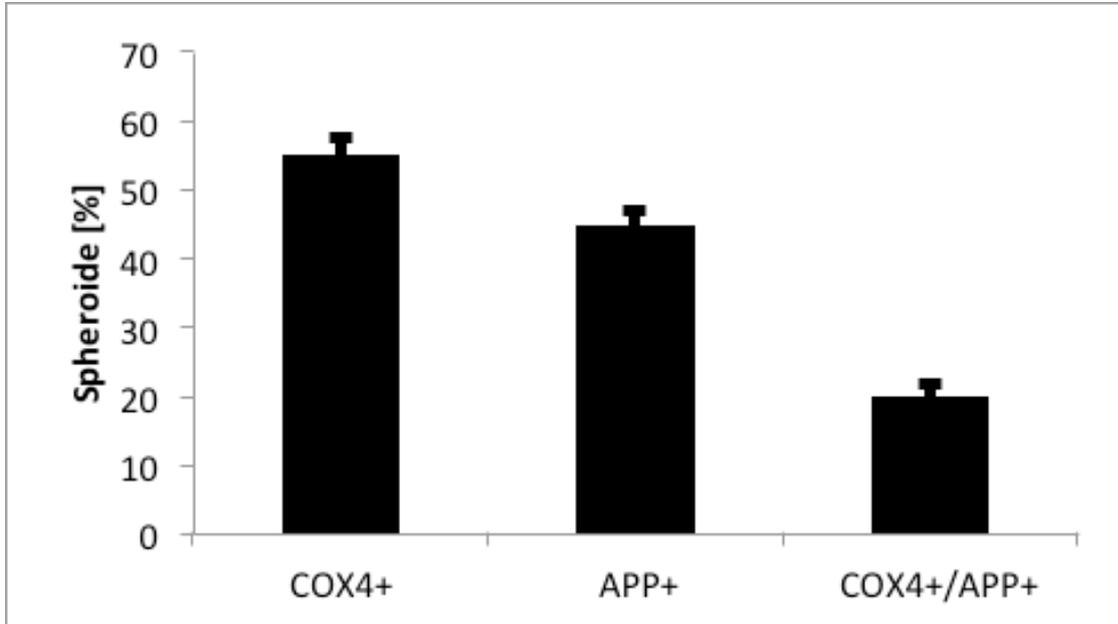


Abbildung 15: Anteil der vesikulären (APP⁺) und mitochondrialen (COXIV⁺) Sphäroide an der Gesamtanzahl (=100%) erfasster Sphäroide, sowie deren Kolokalisierung (COXIV⁺/APP⁺) bei fünf Wochen Cuprizone-intoxizierten Mäusen.

6 Diskussion

MS ist eine komplexe Erkrankung des ZNS. Aufgrund ihres heterogenen Krankheitsbildes ist sie bis heute nicht vollständig verstanden (Keegan & Noseworthy, 2002). In Europa ist sie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen im frühen Erwachsenenalter. In Abhängigkeit davon, welche neuronalen Strukturen betroffen sind, können der Verlauf sowie die klinischen Symptome sehr variabel sein. Es kann dabei zu motorischen, sensorischen und kognitiven neurologischen Ausfällen kommen (Noseworthy et al., 2000). Derzeit gibt es trotz jahrelanger Forschung nur Medikamente, die ausschließlich den Fortschritt der Erkrankung verlangsamen oder akute Symptome lindern, jedoch nicht zur Heilung führen (Steinman et al., 2006; van der Star et al., 2012).

Der Verlust von Neuronen und Synapsen wird für kognitive Beeinträchtigungen und physische Defizite bei an MS Erkrankten mitverantwortlich gemacht (Roosendaal 2011). Umso wichtiger ist daher, den Neuronenverlust genauer zu untersuchen. Bislang gibt es kaum Studien, die sich mit dem Verlust von Neuronen im zerebralen Kortex nach akuter Cuprizone-induzierter Demyelinisierung beschäftigen.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich Gewebe von fünf Wochen Cuprizone-intoxikierten Mäusen gegen PV gefärbt und die PV⁺ Interneurone stereologisch quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der PV⁺ Interneurone im Kortex zwischen der 5 Wochen Cuprizone-intoxikierten Gruppe und der Kontrollgruppe. Der geringe Unterschied wird wahrscheinlich zufällig bedingt sein. Um fundierte Aussagen zu erhalten, wäre die Untersuchung einer größeren Stichprobe erforderlich.

Der Transport von Vesikeln ist lebenswichtig, um die Integrität des Axons zu bewahren (Rühling et al., 2018). Auch ich konnte feststellen, dass mit zunehmender Cuprizone-Intoxikationsdauer der Transport von APP beeinträchtigt wird. Die im Rahmen meiner Arbeit detektierte Akkumulation von APP nach akuter Cuprizone-induzierter Demyelinisierung stimmte mit den Ergebnissen von Hoflich et al. (2016) überein. Anti-APP IHC ist bereits eine Standardmethode, um axonale Transportdefizite, also akuten axonalen Schaden, zu detektieren (Kuhlmann et al., 2002; Ferguson et al., 1997).

Auch der Transport von Zellorganellen insbesondere Mitochondrien ist lebenswichtig für die Integrität des Axons (Rühling et al., 2018). Daher stellt sich die Frage, ob durch den beeinträchtigten Vesikeltransport auch Bestandteile von Mitochondrien akkumulieren.

Um herauszufinden, ob Mitochondrien bzw. der mitochondriale Transport mit zunehmender Cuprizone-Intoxikation beeinträchtigt werden, erfolgte als nächstes eine immunhistochemische Färbung gegen COXIV und VDAC1. Dabei konnte ich feststellen, dass bei zunehmender Cuprizone-Intoxikation mitochondriale (COXIV⁺, VDAC1⁺) Proteine als axonale Sphäroide akkumulieren.

Bei näherer Betrachtung der Gewebeproben, der fünf Wochen Cuprizone intoxikierten Tiere, konnte man erkennen, dass es zu einer vermehrten zytoplasmatischen Färbung kommt, die sich in Form von kleinen COXIV⁺ und VDAC1⁺ Punkten darstellt. Diese zeigt sich zumindest bei den hier verwendeten Antikörperkonzentrationen. Diese „kleinen Punkte“ befinden sich vor allem um die Zellkerne. Da Mitochondrien im Zytoplasma von fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen, entsprechen diese „Punkte“ wahrscheinlich Mitochondrien in aktivierten Mikroglia oder Astrozyten (Rühling et al., 2019). Diese „Punkte“ wurden bei der Quantifizierung natürlich nicht berücksichtigt.

COXIV⁺ Sphäroide waren im Vergleich zu den VDAC1⁺ Sphäroiden bereits nach 3 Wochen signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren. COXIV könnte somit ein sensitiverer Marker als VDAC1 für axonalen, mitochondrialen Schaden sein.

Daraufhin stellte ich mittels Fluoreszenzfärbung gegen COXIV und APP mitochondriale Akkumulationen direkt neben axonalem Schaden fest. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass es bei zunehmender Cuprizone-Intoxikation nicht nur zu vesikulären, sondern auch zu mitochondrialen Trans-

portdefiziten kommt. Anzunehmen ist, dass sich in den Transportvesikeln Bestandteile von Mitochondrien befinden, die durch die Cuprizone-induzierte Schädigung der Axone akkumulieren

6.1.1 Tiermodelle und ihre Grenzen

Da es nur begrenzte Möglichkeiten gibt, Gewebeproben von MS-Patienten zu untersuchen (Denic et al., 2011), sind Tiermodelle von großer Bedeutung, um die Ätiologie der Erkrankung besser verstehen zu können und um therapeutische Ansätze zu entwickeln. Aufgrund der Komplexität der Erkrankung ist es unmöglich, alle Teilaspekte in einem einzigen Tiermodell zu untersuchen und zu erfassen. In der Literatur wird jedoch öfters die Frage gestellt, ob Tiermodelle für die Untersuchung einer solch komplexen Erkrankung überhaupt geeignet sind, nachdem nur bestimmte Merkmale des Krankheitsbildes in einem Tiermodell erforscht werden können (Procaccini et al., 2015).

Tiermodelle unterscheiden sich vor allem bei der Induktion der Erkrankung von der MS bei Menschen. Während die Ätiologie der MS sehr komplex ist, sind die auslösenden Faktoren bei den Tiermodellen entweder Toxine oder eine Immunisierung (Baxter, 2007; Keough et al., 2015; Torkildsen et al., 2008). Bei der Verwendung von Tiermodellen ist es nicht möglich, pathologische Prozesse jahrelang vor einer klinischen Manifestation der Erkrankung zu untersuchen. Nach der Induktion der Erkrankung sind die Symptome binnen weniger Tage bzw. Wochen sichtbar und messbar (Procaccini et al., 2015). Obwohl ein Tiermodell nicht alle klinischen, radiologischen, pathologischen und genetischen Merkmale der MS abdecken kann, sind Tiermodelle bislang aufgrund fehlender Alternativen in der heutigen MS Forschung besonders wichtig (Falco et al., 2011).

Im Rahmen der Cuprizone-Intoxikation werden mehrere Phasen durchlaufen, die es ermöglichen, verschiedene Teilaspekte der MS Erkrankung zu untersuchen. Die einzelne Betrachtung der unterschiedlichen Zeitabschnitte ist daher von Bedeutung. Die erste Woche nach Beginn der Cuprizone-Intoxikation ist durch die Apoptose der Oligodendrozyten gekennzeichnet gefolgt von Mikroglia und Astrozyten Aktivierung (Fischbach et al., 2019, Krauspe et al., 2015). Wie auch ich (siehe oben) feststellen konnte, zeigen Anti-Myelin Färbungen keine Veränderungen in dieser frühen Phase. Zwischen der ersten und der dritten Woche kommt es zu einer vermehrten Akkumulation von Astrozyten und Mikrogliazellen (Kipp et al., 2011). Histochemische Färbungen wie z. B. LFB/PAS können im Gegensatz zu PLP am Ende der dritten Woche bereits eine beginnende Demyelinisierung visualisieren (Chrzanowski et al., 2019). Auch meine Ergebnisse zeigen nur einen extrem geringen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt kann neben dem Verlust von reifen Oligodendrozyten bereits axonaler sowie mitochondrialer Schaden immunhistochemisch sichtbar gemacht werden. Zwischen Woche drei und fünf erlangen Mikrogliazellen ihren vollständig aktivierten Status und phagozytieren die Myelinschicht. Astrozytose, Mikrogliose und akuter axonaler Schaden aggravieren und Demyelinisierung wird noch deutlicher sichtbar mittels IHC (Gudi et al., 2014, Jiangshan et al., 2020).

6.1.2 Neuronenverlust Parallelen bei MS und im Cuprizone-Modell

Im Thalamus von MS Patienten fanden Cifelli et al. (2002) eine Reduktion der Neuronen-Dichte. Dazu passend konnten Lapato et al. (2017) im Cuprizone-Tiermodell einen Verlust von PV⁺ Interneuronen im Hippocampus von 12 Wochen intoxikierten Cuprizone-Mäusen feststellen.

Bei MRT Messungen von MS Patienten konnten sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz Atrophien von spezifischen Gehirnregionen festgestellt werden (Batista et al., 2012; Bergsland et al., 2012; De Stefano et al., 2003). Das Ausmaß der Atrophie scheint in der subkortikalen grauen Substanz größer zu sein als in der kortikalen und korreliert mit der kognitiven Leistung und der klinischen Beeinträchtigung der Patienten (Batista et al., 2012; Houtchens et al., 2007).

In Kongruenz dazu konnten bereits publizierte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen (Hochstrasser et al., 2019), dass es zu Volumenveränderungen in bestimmten Subregionen wie der Capsula Interna, dem CC und dem Thalamus nach chronischer (12 Wochen) Cuprizone Intoxikation kommt. Im zerebralen Kortex hingegen konnte keine Volumenveränderung festgestellt werden. Dies könnte auf den fehlenden Neuronenverlust im Kortex, wie meine Ergebnisse implizieren, zurückzuführen sein.

Volumenverlust kann jedoch nicht nur durch neuronalen Zellverlust, sondern auch durch verschiedenste Faktoren wie Demyelinisierung, Degeneration von Gliazellen, axonale Degeneration oder synaptische Pathologien entstehen (Geurts et al., 2012, Hochstrasser et al., 2019). Bei der durch Cuprizone-induzierten Demyelinisierung kann es zudem zu einer ausgeprägten Astrozytose sowie Mikrogliose kommen. Durch dieses Phänomen könnte bei gleichbleibendem Volumen der neuronale Zellverlust (falls vorhanden) „maskiert“ werden (Hochstrasser et al., 2019). Absolute Zellzahlen, wie sie zum Beispiel stereologisch ermittelt werden können, sind aus diesem Grunde umso wichtiger. Volumenveränderungen im Gehirn nach chronischer Cuprizone-Intoxikation sind wahrscheinlich eher durch axonalen Schaden als durch neuronalen Verlust bedingt (Hochstrasser et al., 2019).

6.1.3 Demyelinisierung alleine kein suffizienter Auslöser für Neuronenverlust?

Nachdem neuronaler Verlust bei MS existiert (Peterson et al., 2001), nimmt man an, dass Demyelinisierung alleine kein suffizienter Auslöser für neuronalen Verlust ist (Hochstrasser et al., 2019). In einem EAE Mausmodell wurde gezeigt, dass es zu Verlust von PV⁺ Interneuronen im primär motorischen Kortex kommt (Falco et al., 2014). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass das EAE Modell ein autoimmun vermitteltes inflammatorisches Tiermodell ist. Dies würde die Theorie unterstützen, dass neben metabolischen Stressoren auch entzündliche Mediatoren notwendig sind, um neuronale Zellverluste im Neokortex, die zu Volumenverlust führen, zu induzieren. Zusätzlich zeigten kürzlich publizierte *post-mortem* Studien keine Assoziation zwischen dem Ausmaß der Demyelinisierung und der Dichte an Neuronen im Neokortex von MS Patienten (Carassiti et al., 2018; Klaver et al., 2015). In einer weiteren *post-mortem* Analyse wurde ein weit verbreiteter Verlust von dendritischen Dornfortsätzen in demyelinisierten und auch nicht-demyelinisierten Regionen des Kortex von MS Patienten beschrieben (Jürgens et al., 2016). Dies könnte zudem darauf hinweisen, dass Demyelinisierung alleine zu keinem neuronalen Verlust führt.

6.1.4 Mitochondriale Schäden als wichtige Komponente der MS-Pathologie

Mitochondrien spielen eine ausschlaggebende Rolle in der Homöostase und Funktion von Neuronen. Mit zunehmender Evidenz stellt sich heraus, dass Dysfunktion von axonalen Mitochondrien und mitochondrialem Transport mitverantwortlich für axonale Degeneration ist (Lin et al., 2006, Sheng et al., 2012). Gestörter Transport und mitochondriale Akkumulationen könnten lokale Energiedefizite und Änderungen der Calcium-Pufferung hervorrufen. Zudem könnten dysfunktionale Mitochondrien reaktive Sauerstoffradikale freisetzen, die das Axon dadurch zusätzlich schwächen (Baltan et al., 2014).

Andere Studien zeigten, dass es schon vor einer offensichtlichen Demyelinisierung zur Akkumulation von Zellorganellen kommt (Gudi et al., 2017, Sorbara et al., 2014). Dies impliziert, dass es sich dabei um einen komplexen Pathomechanismus handelt, der nicht einfach als Konsequenz der Demyelinisierung zu sehen ist. Diese Daten deuten zudem darauf hin, dass es eine starke Korrelation zwischen Mikroglia/Makrophagen - Aktivierung und axonalen Transportdefiziten gibt (Gudi et al., 2017).

Studien, die das EAE Mausmodell verwendeten, zeigten axonale Akkumulationen von COXIV⁺ Mitochondrien in Korrelation mit axonaler Degeneration (BandoY et al., 2015). Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich axonale sowie mitochondriale Schäden an der Seite von fokalen axonalen Degenerationen bei EAE und aktiven MS-Läsionen befinden (Nikic et al., 2011). Die bisherigen Erkenntnisse implizieren, dass Mitochondrien und mitochondriale Schäden in der Pathogenese der MS eine bedeutende Rolle spielen.

Das Cuprizone-Modell ist ein nützliches Instrument, um zwei Hauptaspekte der MS zu untersuchen: Erstens, durch unspezifische Immunzellen ausgelöste Degeneration von Myelin und Axonen und zweitens Remyelinisierung von demyelinisierten Axonen (Jiangshan et al., 2020). Meinen Ergebnissen zufolge dient das Cuprizone-Modell nicht direkt der weiteren Untersuchung des Verlustes von PV⁺ Interneuronen im Kortex von MS Patienten.

Zusammenfassend deuten meine Resultate darauf hin, dass es im Cuprizone-Modell zu vesikulären sowie mitochondrialen Akkumulationen im Bereich des axonalen Schadens kommt. IHC fungiert als ein wertvolles Instrument, um axonalen Schaden im Detail zu untersuchen. Ferner können spezifische Proteine wie COXIV und VDAC1 als selektive Marker für axonalen Schaden dienen. Weitere Studien,

insbesondere an *post-mortem* Gehirnen von MS-Patienten, werden dringend benötigt, um herauszufinden, wie mitochondriale Akkumulationen sich in den unterschiedlichen Läsionen und in den verschiedenen klinischen Stadien verändern. Ein besseres Verständnis von axonalen Läsionen könnte somit zur Entwicklung von potentiellen neuen Therapien beitragen, welche axonalen Schaden bei MS verbessern oder sogar rückgängig machen könnten.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zufällige Platzierung eines gleichmäßigen Rasters auf das zu untersuchende Gewebe. Rote Punkte stellen Überlappung der Raster-Schnittpunkte mit dem Schnitt dar. Durch den gleichmäßigen Abstand der X- und Y Achse sind sie systematisch und aufgrund der zufälligen Positionierung des Rasters gleichzeitig auch willkürlich (random). 2) Festlegung des Zählbereich innerhalb eines Rasterquadrates. Dieser wiederholt sich in jedem Rasterquadrat an der gleichen Stelle (angelehnt an Laubner et al., 2018).	20
Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Festlegung der ROI.....	20
Abbildung 3: Zeigt vier zufällige virtuelle Zählbereiche. In Nummer zwei, dem aktiven zufälligen virtuellen Zählbereich, findet die Zählung statt. Die Ein- und Ausschlusslinien verhindern, dass eine Zelle mit ihrem charakteristischen Zählkriterium doppelt gezählt wird. Befindet sich das Zählkriterium (hier rechte oberste Ecke) innerhalb des Zählbereichs oder berührt eine grüne Linie wie Zellen a, b, c, g, werden die Zellen gezählt. Befindet sich das entsprechende Zählkriterium außerhalb des Zählbereichs oder auf einer roten Linie, wird die Zelle nicht berücksichtigt (d,f,e) (angelehnt an Laubner et al., 2018).	21
Abbildung 4: Cuprizone induzierte Demyelinisierung sichtbar gemacht durch eine anti-PLP Färbung des CC: Kontrolltiere (A), 1 Woche Cuprizone (B), 3 Wochen Cuprizone (C), 5 Wochen Cuprizone (D).	24
Abbildung 5: Die Quantifizierung des Myelinisierungsgrads im CC zeigt einen signifikanten Myelinverlust nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation	24
Abbildung 6: Vergleich der stereologisch ermittelten Anzahl der PV+ Interneurone im Kortex zwischen Kontrolltieren und fünf Wochen Cuprizone-intoxikierten Tieren.....	25
Abbildung 7: Quantifizierung der PV+ Interneurone der einzelnen Tiere.....	25
Abbildung 8: PV+ Interneurone (schwarze Pfeile) im Kortex eines Kontrolltieres	26
Abbildung 9: Anti-APP immunhistochemische Färbung. Gegenüberstellung von CC (A+B) und Cingulum (B+D) von Kontrolltieren (A+B) und fünf Wochen Cuprizone-intoxikierten Tieren (C+D).	27
Abbildung 10: Teil des CC eines Kontrolltieres (Bild A). Perinukleares COXIV+ Material im Kortex eines Kontrolltieres (B Vergrößerung Pfeil). Gezählter Spheroid (D Vergrößerung Pfeil) im Cingulum und nicht berücksichtigter perinuklearer Spheroid (C Vergrößerung Pfeil) im CC von einem 5 Wochen Cuprizone behandelten Tier.	28
Abbildung 11: Vergleich der gezählten COXIV+ Sphäroide der 1, 3, 5 Wochen Cuprizone intoxikierten Tiere mit den Kontrolltieren.....	28

Abbildung 12: Keine VDAC1 ⁺ Sphäroide im CC (A) und Cingulum (B) von Kontrolltieren. VDAC1 ⁺ Sphäroide im CC (C) und Cingulum (D, Pfeil) von 5 Wochen Cuprizone- intoxikierten Tieren.....	29
Abbildung 13: Vergleich der gezählten VDAC1 ⁺ Sphäroide der 1, 3, 5 Wochen Cuprizone- intoxikierten Tiere mit den Kontrolltieren.....	29
Abbildung 14: Immunfluoreszenz Doppelfärbung COXIV (rot) und APP (grün) von 5 Wochen Cuprizone-intoxikierten Tieren.	30
Abbildung 15: Anteil der vesikulären (APP ⁺) und mitochondrialen (COXIV ⁺) Sphäroide an der Gesamtanzahl (=100%) erfasster Sphäroide, sowie deren Kolokalisierung (COXIV ⁺ /APP ⁺) bei fünf Wochen Cuprizone-intoxikierten Mäusen.....	30

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien / Materialien für die Perfusion, Einbettung und Schnittherstellung .	12
Tabelle 2: Chemikalien und Materialien, für die IHC / Immunfluoreszenz.....	13
Tabelle 3: Primäre AK.....	15
Tabelle 4: Sekundäre AK.....	15
Tabelle 5: Festgelegte Einstellungen für die Quantifizierung	22

9 Literaturverzeichnis

Andrews H, White K, Thomson C, Edgar J, Bates D, Griffiths I, Turnbull D, Nichols P (2006) Increased axonal mitochondrial activity as an adaptation to myelin deficiency in the Shiverer mouse. *J Neurosci Res* 83(8):1533–1539.

Bakker DA, Ludwin SK. (1987) Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J Neurol Sci.* Apr;78(2):125-37.

Baldellon C1, Alattia JR, Strub MP, Pauls T, Berchtold MW, Cavé A, Padilla A. (1998) ¹⁵N NMR relaxation studies of calcium-loaded parvalbumin show tight dynamics compared to those of other EF-hand proteins. *Biochemistry.* 37(28):9964-75.

Baltan S (2014) Excitotoxicity and mitochondrial dysfunction underlie age-dependent ischemic white matter injury. *Advances in neurobiology* 11:151–170

Bando Y, Nomura T, Bochimoto H, Murakami K, Tanaka T, Watanabe T, Yoshida S (2015) Abnormal morphology of myelin and axon pathology in murine models of multiple sclerosis. *Neurochem*

Barrientos Antoni I, Barros Mario H, Valnot Isabelle, Rötig Agnes, Rustin Pierre, Tzagoloff Alexander (2002) Cytochrome oxidase in health and disease *Gene* 286, 53-63.

Barkhof F1, Filippi M MRI--the perfect surrogate marker for multiple sclerosis? (2009) *Nat Rev Neurol.* 5(4):182-3.

Batista S1, Zivadinov R, Hoogs M, Bergsland N, Heininen-Brown M, Dwyer MG, Weinstock-Guttman B, Benedict RH. (2012) Basal ganglia, thalamus and neocortical atrophy predicting slowed cognitive processing in multiple sclerosis. *J Neurol.*;259(1):139-46.

Baxter, A. G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*, 7(11), 904-912.

Beers DR1, Ho BK, Siklós L, Alexianu ME, Mosier DR, Mohamed AH, Otsuka H, Kozovska ME, McAlhany RE, Smith RG, Appel SH. (2001) Parvalbumin overexpression alters immune-mediated increases in intracellular calcium, and delays disease onset in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.*;79(3):499-509.

Berghoff, S.A.; Dükung, T.; Spieth, L.; Winchenbach, J.; Stumpf, S.K.; Gerndt, N.; Kusch, K.; Ruhwedel, T.; Möbius, H.; Saher, G (2017). Blood-brain barrier hyperpermeability precedes demyelination in the cuprizone model. *Acta Neuropathol. Commun.*, 5, 94

Bergsland N1, Horakova D, Dwyer MG, Dolezal O, Seidl ZK, Vaneckova M, Krasensky J, Havrdova E, Zivadinov R. (2012) Subcortical and cortical gray matter atrophy in a large sample of patients with clinically isolated syndrome and early relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 33(8):1573-8.

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück H (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain J Neurol* 123(Pt 6):1174–1183

Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD (2000). Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology*; 48:893–901.

Bö L1, Geurts JJ, Mörk SJ, van der Valk P (2006). Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl.*;183:48-50.

Buddeberg, Kerschensteiner Martin, Schwab Martin E. (2003) Die Bedeutung der axonalen Schädigung bei Multipler Sklerose *Bigna S. Schweiz Med Forum* Nr. 38 17.

- Calabrese M1, Magliozzi R2, Ciccarelli O3, Geurts JJ4, Reynolds R5, Martin R6. (2015) Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 16(3):147-58.
- Carassiti D1, Altmann DR2, Petrova N1, Pakkenberg B3, Scaravilli F1, Schmierer K1,4. (2018) Neuronal loss, demyelination and volume change in the multiple sclerosis neoKortex. *Neuropathol Appl Neurobi-ol.*;44(4):377-390.
- Carlton, H. H. (1966). Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. *Toxicol Appl Pharmacol*, 8(3), 512-521.
- Carlton, H. H. (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.
- Carlton, H. H. (1969). Spongiform encephalopathy induced in rats and guinea pigs by cuprizone. *Experimental and Molecular Pathology*, 10(3), 274-287. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0014-4800\(69\)90057-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4800(69)90057-4)
- Cates MS, Teodoro ML, Phillips GN (2002). Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. *Biophysical Journal.* 82 (3): 1133–46.
- Cerina M1, Narayanan V2, Göbel K2, Bittner S3, Ruck T2, Meuth P2, Herrmann AM2, Stangel M4, Gudi V5, Skripuletz T5, Daldrup T6, Wiendl H2, Seidenbecher T6, Ehling P2, Kleinschnitz C7, Pape HC6, Budde T6, Meuth SG8. (2017) The quality of cortical network function recovery depends on localization and degree of axonal demyelination. *Brain Behav Immun.* 59:103-117.
- Chard DT1, Griffin CM, Parker GJ, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH (2002). Brain atrophy in clinically early re-lapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain.* 125(Pt 2):327-37.
- Chrzanowski, U.; Schmitz, C.; Horn-Bochtler, A.; Nack, A.; Kipp, M. (2019) Evaluation strategy to determine reliable demyelination in the cuprizone model. *Metab. Brain Dis.*, 34, 681–685.
- Clements RJ1, McDonough J, Freeman EJ (2008). Distribution of parvalbumin and calretinin immunoreactive interneurons in motor Kortex from multiple sclerosis post-mortem tissue. *Exp Brain Res.*;187(3):459-65.
- Cotter D1, Landau S, Beasley C, Stevenson R, Chana G, MacMillan L, Everall I (2002). The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate Kortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1;51(5):377-86.
- Cifelli A1, Arridge M, Jezzard P, Esiri MM, Palace J, Matthews PM (2002). Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann Neurol.*;52(5):650-3.
- DeFelipe J1. (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neoKortex. *J Chem Neuroanat.*14(1):1-19.
- De Stefano N1, Guidi L, Stromillo ML, Bartolozzi ML, Federico A (2003) Imaging neuronal and axonal degeneration in multiple sclerosis. *Neurol Sci.*
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15:545–558
- Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18(1), 21-29.
- Dieni S1, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons *J Cell Biol.* Mar 19;196(6):775-88.
- Disanto, G, Barro, C, Benkert, P (2017). Serum neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*; 81: 857–870.

- Draheim, T.; Liessem, A.; Scheld, M.; Wilms, F.; Weissflog, M.; Denecke, B.; Kensler, T.H.; Zendedel, A.; Beyer, C.; Kipp, M. (2016) et al. Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia*, 64, 2219–2230.
- Dutta R1, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, Gudz T, Macklin WB, Lewis DA, Fox RJ, Rudick R, Mirnic K, Trapp BD (2006). Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. Mar;59(3):478-89.
- Dutta, R.; Chang, A.; Doud, M.K.; Kidd, G.J.; Ribaldo, M.V.; Young, E.A.; Fox, R.J (2011).; Staugaitis, S.M.; Trapp, B.D. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.*, 69, 445–454.
- Dutta R1, Trapp BD (2014). Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. *Curr Opin Neurol*. 27(3):271-8.
- Enzinger, C.; Pinter, D.; Rocca, M.A.; De Luca, J.; Sastre-Garriga, J.; Audoin, B.; Filippi, M (2016). Longitudinal fMRI studies: Exploring brain plasticity and repair in MS. *Mult. Scler.*, 22, 269–278.
- Eyles DW1, McGrath JJ, Reynolds GP (2002). Neuronal calcium-binding proteins and schizophrenia. *Schizophr Res*. 1;57(1):27-34.
- Falco A1, Pennucci R, Brambilla E, de Curtis I (2014). Reduction in parvalbumin-positive interneurons and inhibitory input in the Kortex of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Brain Res*.;232(7):2439-49.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain J Neurol* 120(Pt 3):393–399 14.
- Ferguson IA1, Schweitzer JB, Johnson EM Jr (1990). Basic fibroblast growth factor: receptor-mediated internalization, metabolism, and anterograde axonal transport in retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 10(7):2176-89.
- Figueiredo C1, Pais TF, Gomes JR, Chatterjee S (2008). Neuron-microglia crosstalk up-regulates neuronal FGF-2 expression which mediates neuroprotection against excitotoxicity via JNK1/2. *J Neurochem*. 107(1):73-85.
- Fischbach, F.; Nedelcu, J.; Leopold, P.; Zhan, J.; Clarner, T.; Nellesen, L.; Beissel, C.; van Heuvel, Y.; Goswami, A.; Weis, J.; et al (2019). Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3. *Glia*, 67, 263–276.
- Geurts JJG, Calabrese M, Fisher E, Rudick RA (2012). Measurement and clinical effect of grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*;11:1082–1092.
- Glaser J, Greene G, Hendricks S (2006). *Stereology for Biological Research with a Focus on Neuroscience*. mbf Press.
- Grateron L1, Cebada-Sanchez S, Marcos P, Mohedano-Moriano A, Insausti AM, Muñoz M, Arroyo-Jimenez MM, Martinez-Marcos A, Artacho-Perula E, Blazot X, Insausti R (2003). Postnatal development of calcium-binding proteins immunoreactivity (parvalbumin, calbindin, calretinin) in the human entorhinal Kortex. *J Chem Neuroanat*. 26(4):311-6.
- Groebe, A., Clarner, T., Baumgartner, H., Dang, J., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrocytosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. *Cerebellum*, 8(3), 163-174.
- Groemer TW, Thiel CS, Holt M, Riedel D, Hua H, Huve J, Wilhelm BG, Klingauf J (2011) Amyloid precursor protein is trafficked and secreted via synaptic vesicles. *PLoS One* 6(4):e18754.
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., & Stangel, M. (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(73).

- Gudi V, Gai L, Herder V, Tejedor LS, Kipp M, Amor S, Suhs KW, Hansmann F et al (2017) Synaptophysin is a reliable marker for axonal damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 76:109–125.
- Han SM, Baig HS, Hammarlund M (2016) Mitochondria localize to injured axons to support regeneration. *Neuron* 92(6):1308–1323.
- Hennequin G, Agnes EJ, Vogels TP (2017) Inhibitory plasticity: balance, control, and codependence. *Annu Rev Neurosci* 40:557– 579.
- Hiremath, M.M.; Chen, V.S.; Suzuki, K.; Ting, J.P.; Matsushima, G.K. (2008) MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. *J. Neuroimmunol.*, 203, 23–32.
- Hiremath, M. M., Saito, H., Knapp, G. H., 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.
- Hochstrasser T, Jiangshan Z, Rühling S, Schmitz C, Kipp M (2018) Do pre-clinical multiple sclerosis models allow us to measure neurodegeneration and clinical progression? *Expert Rev Neurother* 18: 1–3.
- Hochstrasser T1,2, Rühling S3,4, Hecher K5,6, Fabisch KH7,8, Chrzanowski U9,10, Brendel M11, Eckenweber F12, Sacher C13, Schmitz C14, Kipp M15 (2019). Stereological Investigation of Regional Brain Volumes after Acute and Chronic Cuprizone-Induced Demyelination Cells. *Sep 3;8(9)*. pii: E1024.
- Hoffmann K1, Lindner M, Gröticke I, Stangel M, Löscher H (2007). Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Exp Neurol*;210(2):308-21.
- Hoflich KM, Beyer C, Clarner T, Schmitz C, Nyamoya S, Kipp M, Hochstrasser T (2016) Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: a comparative approach. *Brain Res* 1650:125–133.
- Houtchens MK1, Benedict RH, Killiany R, Sharma J, Jaisani Z, Singh B, Weinstock-Guttman B, Guttmann CR, Bakshi R (2007). Thalamic atrophy and cognition in multiple sclerosis. *Neurology*. *Sep 18;69(12)*:1213-23.
- Jiangshan Zhan 1, Teresa Mann 1, Sarah Joost 1, Newshan Behrangi 1, Marcus Frank 2, Markus Kipp 1 (2020) The Cuprizone Model: Dos and Do Nots *Review Cells*. *Mar 31;9(4)*:843.
- Jürgens T1, Jafari M2, Kreutzfeldt M3, Bahn E4, Brück H4, Kerschensteiner M5, Merkler D6 (2016). Reconstruction of single cortical projection neurons reveals primary spine loss in multiple sclerosis. *Brain*;139(Pt 1):39-46.
- Keegan, B. M., & Noseworthy, J. H. (2002). Multiple sclerosis. *Annu Rev Med*, 53, 285-302.
- Keough, M. B., Jensen, S. K., & Yong, V. H. (2015). Experimental Demyelination and Remyelination of Murine Spinal Cord by Focal Injection of Lysolecithin. *Journal of Visualized Experiments : JoVE(97)*, 52679.
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*, 118(6), 723-736.
- Kipp, M., & Baumgartner, H. (2011). “The cuprizone model and multiple sclerosis: disparities and similarities“. (Dissertation), RWTH Aachen University. Retrieved from <http://publications.rwth-aachen.de/record/64260/files/3773.pdf>
- Kipp M, Gingele S, Pott F, Clarner T, van der Valk P, Denecke B, Gan L, Siffrin V, Zipp F, Dreher W, Baumgartner W, Pfeifenbring S, Godbout R, Amor S, Beyer C (2011) BLBP-expression in astrocytes during experimental demyelination and in human multiple sclerosis lesions. *Brain Behav Immun.*; 25(8):1554-68.
- Kipp M1, van der Valk P, Amor S (2012). Pathology of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*;11(5):506-17.
- Kipp M1, Wagenknecht N, Beyer C, Samer S, Wuerfel J, Nikoubashman O (2015).Thalamus pathology in multiple sclerosis: from biology to clinical application.*Cell Mol Life Sci*. *Mar;72(6)*:1127-47.

Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S (2017) Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective *Brain Pathol* (Zurich, Switzerland) 27(2):123–137.

Kiessling (2013) Mehr als 85% aller Granularzellen im menschlichen Kleinhirn entstehen postnatal – ohne Unterschied zwischen plötzlichen Kindstod und Kontrollfällen, Dissertation

B Kadenbach 1, M Hüttemann, S Arnold, I Lee, E Bender (2000) Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase *Free Radic. Biol. Med.* 29, 211-221.

Klaver R1, Popescu V, Voorn P, Galis-de Graaf H, van der Valk P, de Vries HE, Schenk GJ, Geurts JJ (2015). Neu-ronal and axonal loss in normal-appearing gray matter and subpial lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.*;74(5):453-8.

Krauspe, B.M.; Dreher, W.; Beyer, C.; Baumgartner, W.; Denecke, B.; Janssen, K.; Langhans, C.D.; Clarner, T.; Kipp, M (2015). Short-term cuprizone feeding verifies N-acetylaspartate quantification as a marker of neurodegeneration. *J. Mol. Neurosci.*, 55, 733–748.

Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL et al (1990) Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4):1561–1565

Kornek B1, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Lington C, Schmidbauer M, Lassmann H (2000). Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions *Am J Pathol.*;157(1):267-76

Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck H (2002) Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain J Neurol* 125(Pt 10): 2202–2212 5.

Lapato AS1, Szu JI2, Hasselmann JPC3, Khalaj AJ3, Binder DK4, Tiwari-Woodruff SK5 (2017). Chronic demyelination-induced seizures. *Neuroscience.* 27;346:409-422.

Laubner Maria (2018) Analyse der Häufigkeit stereologischer Publikationen und deren Auswertung über ViLiP, Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Lin MT1, Beal MF (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.*;443(7113):787-95.

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.

Lindner M, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M (2009) Chronic toxic demyelination in the central nervous system leads to axonal damage despite remyelination. *Neurosci Lett* 453(2): 120–125.

Lucchinetti, C. et al. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707–17

Maarten E Witte 1 , Adrian-Minh Schumacher 1 , Christoph F Mahler 1 , Jan P Bewersdorf 1 , Jonas Lehmitz 2 , Alexander Scheiter 2 , Paula Sánchez 1 , Philip R Williams 3 , Oliver Griesbeck 4 , Ronald Naumann 5 , Thomas Misgeld 6 , Martin Kerschensteiner (2019) Calcium Influx through Plasma-Membrane Nanoruptures Drives Axon Degeneration in a Model of Multiple Sclerosis. 101(4):615-624.e5.

Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathology*, 11(1), 107-116.

McCabe BD1, Marqués G, Haghghi AP, Fetter RD, Crotty ML, Haerry TE, Goodman CS, O'Connor MB (2003). The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuro-muscular junction. *Neuron.* 39(2):241-54.

- Niki I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück H, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M (2011) A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med.* 17(4):495-9.
- Nikoletopoulou V1, Lickert H, Frade JM, Rencurel C, Giallonardo P, Zhang L, Bibel M, Barde YA (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature.* 467(7311):59-63.
- Norkute, A., Hieble, A., Braun, A., Johann, S., Clarner, T., Baumgartner, H., . . . Kipp, M. (2009). Cuprizone treatment induces demyelination and astrocytosis in the Mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, 87(6), 1343-1355.
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., & Weinshenker, B. G. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343(13), 938-952.
- Oh J1, O'Connor PW (2015). Established disease-modifying treatments in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 28(3):220-9.
- Ohno N1, Chiang H1, Mahad DJ1, Kidd GJ1, Liu L1, Ransohoff RM1, Sheng ZH2, Komuro H1, Trapp BD3 (2014). Mitochondrial immobilization mediated by syntaphilin facilitates survival of demyelinated axons. *Proc Natl Acad Sci U S A.*111(27):9953-8.
- Ostermeier I, S Iwata, H Michel (1996) Cytochrome c oxidase Affiliations expand *Curr Opin Struct Biol* 6(4):460-6.
- Penner, I.K.; Aktas, O (2017). Functional reorganization is a maladaptive response to injury—NO. *Mult. Scler.*, 23, 193–194.
- Peterson JW1, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001). Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* Sep;50(3):389-400.
- Pott, F., Gingele, S., Clarner, T., Dang, J., Baumgartner, H., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the Maus basal ganglia. *Brain Res*, 1305, 137-149.
- Purves D1, Snider WD, Voyvodic JT (1988). Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the auto-nomic nervous system. *Nature.* 10;336(6195):123-8.
- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., & Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone Maus model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*, 47, 485-505.
- Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol*, 759, 182-191.
- Pure, E., & Cuff, C. A. (2001). A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med*, 7(5), 213-221.
- Roy SZhang B Lee VM, et al. (2005) Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*;109:5–13
- Roosendaal SD1, Bendfeldt K, Vrenken H, Polman CH, Borgwardt S, Radue EW, Kappos L, Pelletier D, Hauser SL, Matthews PM, Barkhof F, Geurts JJ (2011). Grey matter volume in a large cohort of MS patients: relation to MRI parameters and disability. *Mult Scler.* 17(9):1098-106.
- Rovaris M1, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M (2006). Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol.* 5(4):343-54.
- Ruiz F1, Vigne S1, Pot C2 (2019). Resolution of inflammation during multiple sclerosis. *Semin Immunopathol.*
- Rühling S, Kramer F, Schmutz S, Amor S, Jiangshan Z, Schmitz C, Kipp M, Hochstrasser T (2018). Visualization of the Breakdown of the Axonal Transport Machinery: a Comparative Ultrastructural and Immunohistochemical Approach. *Mol Neurobiology*

- Schirmer L, Antel JP, Bruck H, Stadelmann C (2011) Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathol (Zurich, Switzerland)* 21(4):428–440.
- Schmitz C. (1998) Variation of fractionator estimates and its prediction. *Anat Embryol (Berl)*; 198: 371-97.
- Schmitz C, Hof PR (2005). Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*; 130: 813-31.
- Sheng M, Kim MJ (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science (New York, NY)* 298(5594):776–780. <https://doi.org/10.1126/science.1075333>
- Sheng ZH1, Cai Q (2012). Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 13(2):77-93.
- Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S (1994) Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol* 88(5):433–439 12.
- 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. *The American Journal of Pathology*, 172(4), 1053-1061.
- Sorbara CD, Wagner NE, Ladwig A, Nikic I, Merkler D, Kleele T, Marinkovic P, Naumann R et al (2014) Pervasive axonal transport deficits in multiple sclerosis models. *Neuron* 84(6):1183–1190
- Sormani MP, Filippi M, De Stefano N; MAGNIMS Steering Committee, Ebers G, Daumer M (2009). MRI as an out-come in multiple sclerosis clinical trials. *Neurology.* Dec 1;73(22):1932; author reply 1932-3.
- 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.
- Stone JR, Singleton RH, Povlishock JT (2000) Antibodies to the Cterminus of the beta-amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic axonal injury. *Brain Res* 871(2):288–302
- Taylor, L. C., Gilmore, H., & Matsushima, G. K. (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol*, 19(3), 467-479.
- Teunissen, CE, Khalil, M (2012). Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler*; 18: 552–556.
- Tischner D, Reichardt HM (2007) Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Mol Cell Endocrinol* 275:62–70
- Torkildsen, ., Brunborg, L. A., Myhr, K. M., & B., L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica*, 117, 72-76.
- Trapp BD1, Nave KA (2008). Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.*;31:247-69.
- Trapp BD1, Ransohoff R, Rudick R (1999). Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol.*;12(3):295-302.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338(5):278–285.
- Trepel M. *Neuroanatomie Struktur und Funktion* 5. Auflage Urban und Fischer Elsevier
- Tyan SH, Shih AY, Walsh JJ, Maruyama H, Sarsoza F, Ku L, Eggert S, Hof PR et al (2012) Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol Cell Neurosci* 51(1–2):43–52.
- van der Star, B. J., Vogel, D. H., Kipp, M., Puentes, F., Baker, D., & Amor, S. (2012). In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11(5), 570-588.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D (2004), et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis *Bioessays*; 26 445-53

Vander Heiden MG, Li XX, Gottlieb E, Hill RB, Thompson CB, Colombini M (2001): Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. In: *J. Biol. Chem.* 276, Nr. 22, S. 19414–9.

Wagenknecht N1, Becker B1, Scheld M1, Beyer C1, Clarner T1, Hochstrasser T2, Kipp M3 (2016). Thalamus Degeneration and Inflammation in Two Distinct Multiple Sclerosis Animal Models. *J Mol Neurosci.* 2016 Sep;60(1):102-14.

Waxman, S.G. (2006) Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 932–941

Wingerchuk DM1, Carter JL2 (2014). Multiple sclerosis: current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. *Mayo Clin Proc.* Feb;89 (2):225-40.

10 Eidesstattliche Versicherung

Schmutz, Selina

Eidesstattliche Versicherung

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

Quantifizierung & Visualisierung von neurodegenerativen Aspekten der Multiplen Sklerose im Cuprizone-Mausmodell: Neuronenverlust, axonaler mitochondrialer Schaden

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 Fundstell 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.

Wien, den 05.05.2022 Selina Schmutz

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht haben:

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, sowie bei meiner Betreuerin, Prof. Dr. Tanja Hochstrasser, für die exzellente Betreuung meiner Promotion bedanken.

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

Ein besonderer Dank ergeht ferner an die Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München, insbesondere Frau Astrid Baltruschat, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Zu guter Letzt möchte ich besonders meinem Kollegen Kai Fabisch für die schöne Zeit im Labor, Theres Pasler für die graphische Beratung und meinen Eltern, die mich immer und überall nach bestem Wissen unterstützt haben, danken.