

Aus der Anatomie II
Lehrstuhl der Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Christoph Schmitz



**Ultrastrukturelle und funktionelle Pathologien bei metabolischer
Oligodendrogliopathie: Relevanz für die Multiple Sklerose**

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

vorgelegt von
Felix Martin Anton Schweiger

aus
Würzburg

2023

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Markus Kipp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

PD Dr. Siegfried Kösel

PD Dr. Astrid Blaschek

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Tanja Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2023

I. Inhaltsverzeichnis

I.	<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	3
II.	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	6
1.	<u>EINLEITUNG</u>	8
1.1.	MULTIPLE SKLEROSE	8
1.1.1.	ALLGEMEINES	8
1.1.2.	KLINIK UND DIAGNOSTIK	8
1.1.3.	PATHOLOGIE	10
1.1.4.	ÄTIOLOGIE	11
1.1.5.	THERAPIE	12
1.2.	PHYSIOLOGIE DER OLIGODENDROZYTEN	12
1.3.	PATHOGENESE UND DIE ROLLE DER OLIGODENDROZYTEN BEI DER MS	13
1.4.	TOXISCHES DEMYELINISIERUNGS-TIERMODELL: CUPRIZONE	16
1.5.	DREIDIMENSIONALE ULTRASTRUKTURELLE UNTERSUCHUNG	17
1.6.	FRAGESTELLUNG	18
2.	<u>MATERIAL</u>	19
2.1.	GERÄTE, VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE UND PROGRAMME	19
2.1.1.	GERÄTE	19
2.1.2.	VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE	20
2.1.3.	PROGRAMME	22
2.2.	CHEMIKALIEN, SEREN, PUFFER, LÖSUNGEN	23
2.2.1.	CHEMIKALIEN	23
2.2.2.	SEREN	24
2.2.3.	PUFFER UND LÖSUNGEN	24
2.3.	ANTIKÖRPER	28
2.4.	TIERE	28
3.	<u>METHODEN</u>	29
3.1.	TIERVERSUCHSGRUPPEN, CUPRIZONE-GABE UND MATERIALGEWINNUNG	29
3.1.1.	TIEREXPERIMENTELLE VERSUCHSANSÄTZE	29
3.1.2.	CUPRIZONE-ZUBEREITUNG UND -VERABREICHUNG	29
3.1.3.	MATERIALGEWINNUNG	29
3.2.	IMMUNHISTOCHEMIE	32
3.2.1.	PROTOKOLL	33
3.2.2.	BETRACHTUNG UND DIGITALISIERUNG DER SCHNITTE	36
3.3.	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE UND SEMIDÜNNNSCHNITTE	36

Inhaltsverzeichnis

3.4.	SERIELLE RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	36
3.5.	ELEKTROPHYSIOLOGIE: [ENGL.] COMPOUND ACTION POTENTIAL (CAP)	37
3.6.	OLINEU-KULTUR	38
3.6.1.	LIVE-CELL IMAGING	38
3.7.	AUSWERTUNG	39
3.7.1.	HIRNREGION (R265)	39
3.7.2.	QUANTIFIZIERUNG UND ANALYSE VON IMMUNFLUORESCENZSCHNITTEN	39
3.7.3.	TEM	39
3.7.4.	REKONSTRUKTION VON AXONEN (3D-EM)	39
3.7.5.	QUANTIFIZIERUNG VON CoMYDs (3D-EM)	39
3.7.6.	QUANTIFIZIERUNG DER AXONDICKENMESSUNG UND SYMMETRIE (3D-EM)	40
3.7.7.	CAP	40
3.7.8.	RAMIFIZIERUNG ([ENGL.] LIVE CELL IMAGING)	40
3.7.9.	STATISTISCHE AUSWERTUNG	41
4.	ERGEBNISSE	42
4.1.	OLIGODENDROZYTENSTRESS GEHT DEMYELINISIERUNG IN VIVO VORAUSS	42
4.2.	AUFTRETEN KOMPAKTER MYELINABTRENNUNGEN (CoMYD) NACH DREIWÖCHIGER CUPRIZONE-GABE: IMMUNHISTOCHEMISCHE UND ULTRASTRUKTURELLE (3D-EM) CHARAKTERISIERUNG	45
4.3.	ABNAHME DER SCHNELLEN DEPOLARISATIONSANTWORT IM CC NACH DREIWÖCHIGER CUPRIZONE-GABE	51
4.4.	AUFTRETEN VON CoMYDs NACH EINWÖCHIGER CUPRIZONE-GABE	52
4.5.	REVERSIBLE RETRAKTION OLIGODENDROZYTÄRER FORTSÄTZE DURCH KOMPLEX-IV-INHIBITOR IN VITRO	54
4.5.1.	RETRAKTION OLIGODENDROZYTÄRER FORTSÄTZE DURCH KOMPLEX-IV-INHIBITOR	54
4.5.2.	REVERSIBILITÄT DER RETRAKTION OLIGODENDROZYTÄRER FORTSÄTZE NACH SUBLETHALEM STRESS IN VITRO	55
5.	DISKUSSION	62
5.1.	CUPRIZONE MODELL: OLIGODENDROZYTÄRER STRESS GEHT DEMYELINISIERUNG IN VIVO VORAUSS	62
5.2.	CoMYD: AUFTRETEN UND MÖGLICHE PATHOGENESE	63
5.2.1.	METHODIK	64
5.2.2.	MÖGLICHE PATHOGENESE	65
5.3.	FUNKTIONELLE DEMYELINISIERUNG BEI MIKROSKOPISCHER INTAKTHEIT DES MYELINS	68
5.4.	DYNAMIK DER CoMYDs IN ABHÄNGIGKEIT DES OLIGODENDROZYTÄREN STRESSES?	69
5.5.	RETRAKTION OLIGODENDROZYTÄRER FORTSÄTZE DURCH METABOLISCHEN STRESS	70
5.6.	AUSBLICK	72
6.	ZUSAMMENFASSUNG	73
III.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
IV.	TABELLENVERZEICHNIS	77

Inhaltsverzeichnis

<u>V.</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>78</u>
<u>VI.</u>	<u>PUBLIKATIONSLISTE</u>	<u>87</u>
<u>VII.</u>	<u>AFFIDAVIT</u>	<u>88</u>
<u>VIII.</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>89</u>
<u>IX.</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>90</u>

II. Abkürzungsverzeichnis

3D-EM	serielle Rasterelektronenmikroskopie
AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
C	Celcius
ca	circa
CC	Corpus Callosum
CIS	engl.: clinically isolated syndrom für klinisch isoliertes Syndrom
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoMyD	engl.: Compact Myelin Detachment für kompakte Myelinabtrennung
Cup	Cuprizon
d	Tage
DE	Deutschland
DMT	engl.: disease-modifying treatment für verlaufsmodifizierende Therapie
DNA	engl.: deoxyribinucleic acid für Desoxyribonukleinsäure
Dr. rer. nat.	lateinisch: doctor rerum naturalium; Doktor der Naturwissenschaft
EBV	Epstein-Barr-Virus
EM	Elektronenmikroskopie
engl.	englisch
FELASA	engl.: Federation of European Laboratory Animal Science Association
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HIER	engl.: heat-induced Epitope retrieval
Hz	Hertz
IHC	Immunhistochemie
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
l	Liter
M	molare
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	engl.: myelin basic protein
mg	Milligramm
min	Minuten
mind	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mOsm	Milliosmol
ms	Millisekunden
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl/Gruppe
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
ns	nicht signifikant
OT	Objektträger
PBS	Phosphatpufferlösung
PFA	Paraformaldehyd

Abkürzungsverzeichnis

PPMS	<i>Primär progrediente MS</i>
RI	<i>Ramifizierungsindex</i>
ROI.....	<i>engl.: Region of Interest für Bereich von Interesse</i>
RRMS.....	<i>engl.: relapsing remitting MS für schubförmige remittierende MS</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
s.....	<i>Sekunden</i>
SA	<i>Sodiumazid</i>
SEM	<i>engl.: standard error of mean für Standardfehler</i>
SPMS	<i>sekundär progrediente MS</i>
TEM	<i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>
TierSchG	<i>Tierschutzgesetz</i>
W.....	<i>Woche</i>
z.B.....	<i>zum Beispiel</i>
ZNS	<i>Zentralnervensystem</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
µl	<i>Mikroliter</i>
µM.....	<i>Mikromolar</i>
µs.....	<i>Mikrosekunden</i>

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

1.1.1. Allgemeines

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Sie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter und der Hauptgrund für irreversible Behinderungen bei Menschen im mittleren Lebensalter [1]. Die Krankheit kann schubförmig oder progredient in allen Altersgruppen auftreten, die ersten Symptome beginnen aber meist im 20. bis 50. Lebensjahr [2]. Die Prävalenz der MS ist regional unterschiedlich: Sie reicht von 2/100.000 Menschen in Asien und Sub-Sahara-Afrika bis zu 270/100.000 Menschen in Teilen Europas [3, 4]. Frauen sind 2-3 mal häufiger betroffen als Männer [1, 2, 4]. In den vergangenen Jahrzehnten kam es neben einer globalen Zunahme der Prävalenz (v.a. bedingt durch das längere Überleben mit der Krankheit) zu einer weltweiten Zunahme der Inzidenz und des Inzidenz-Verhältnisses der Geschlechter [1]. Daten aus der MS-Datenbank in Dänemark zeigen, dass die Inzidenzzunahme primär bei Frauen erfolgte (Verdopplung der Inzidenz) und die Inzidenz der Männer in den letzten 60 Jahren nur marginal zunahm [5]. Gesamtökonomisch hat die Erkrankung durch die hohe Prävalenz und den Arbeitsausfall (durch die bleibenden physischen und psychischen Einschränkungen) eine große Bedeutung mit jährlichen Kosten pro Patient in Höhe von 10.000 bis 130.000 € (je nach Krankheitsfortschritt) [6]. In der Bundesrepublik sind das (bei einer anzunehmenden Prävalenz von bis zu 320/100.000 [7]) 2,5 -33 Milliarden €/Jahr.

1.1.2. Klinik und Diagnostik

Je nach Lokalisation der initialen Entzündung im ZNS sind die häufigsten Erstsymptome der MS in Tabelle 1 dargestellt.

Lokalisation	Symptome
N. opticus	Einseitiger Visusverlust, schmerzhaftes Augenbewegungen
Rückenmark	Hemi-/Para-/Monoparese, Hypästhesie, Parästhesie, Dysästhesie, Spinktertonusdysfunktion (Miktion/Defäkation)
Hirnstamm/Cerebellum	Diplopie, Vertigo, Dysarthrie, Gangataxie
Zerebrale Hemisphären	Brachiofaziale Hemiparese/ - Hemihypästhesie, psychische Störungen

Tabelle 1: Erstsymptomatik der MS entsprechend der Lokalisation (adaptiert von [3])

Einleitung

Die Symptome treten meist subakut (Stunden bis Tage) auf und remittieren häufig selbstständig nach Wochen bis Monaten. Diese Erstsymptomatik wird als „klinisch isoliertes Syndrom“ (engl.: *clinically isolated syndrom* – CIS) bezeichnet [8]. Ein Großteil der CIS-Diagnostizierten hat im Verlauf weitere Symptomanfälle (Schübe) und wird dadurch per Definition MS-diagnostiziert (Kriterien sind weiter unten aufgeführt) [9]. Bis heute gibt es keinen Test, der einem unmittelbar anzeigt, ob ein Patient an einer MS leidet. Die Diagnose ist noch immer eine Ausschlussdiagnose und die sogenannten *McDonald-Kriterien* [10] zur Diagnostizierung der MS sollten zur Erhöhung der Sensitivität nur bei klarer CIS-Symptomatik angewandt werden [3, 10].

Zur Diagnose einer MS braucht es die klinische und/oder radiologische Disseminierung von ZNS-Läsionen in Ort und Zeit [10]. Liquorspezifische oligoklonale Immunglobulin G-Banden erhärten den MS-Verdacht bzw. erhöhen die Wahrscheinlichkeit und Geschwindigkeit eines Übergangs von CIS zu MS [3].

Der Verlauf der MS ist heterogen und die Unterteilung in Subtypen schwierig, da diese rein deskriptiv sind und es zu Überlappungen kommen kann.

Abbildung 1 zeigt die aktuelle Revision (2013) zur Beschreibung der MS Phänotypen.

Ca. 85% der MS-Patienten haben initial einen schubförmigen Verlauf (engl.: *relapsing remitting MS*, RRMS) mit Phasen der Exazerbation, aber auch der vollständigen Remission. Ca. 15 % haben einen primär progredienten Verlauf (PPMS), bei welchem es zu einer zunehmenden neurologischen Beeinträchtigung kommt. Während ältere Studien nahelegen, dass die Mehrheit der RRMS Patienten nach 10-20 Jahren in die sekundär progrediente Form (SPMS) übergehen [3, 9, 11] zeigen neuere Studien verminderte RRMS-zu-SPMS-Konversionsraten von 15-30% [8, 12, 13]. Andererseits gibt es eine prospektive Langzeituntersuchung der Universität von Kalifornien in San Francisco, die eine sogenannte „stille Progression“ (engl.: *silent progression*) bei RRMS beschreibt [14]. Hierbei zeigt sich, dass RRMS Patienten (entsprechende Kriterien waren erfüllt), größtenteils unabhängig ihrer Schubaktivität, eine Langzeitverschlechterung aufweisen. Es wurde angenommen, dass weder Arzt noch Patient aufgrund der langsamen Dynamik diese Progression initial wahrgenommen haben.

Die tatsächliche Konversionsrate von RRMS zu SPMS bzw. das Ausmaß der Langzeitverschlechterung ist in Zeiten der neuen Therapiemöglichkeiten (siehe Seite 12) weiterhin unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

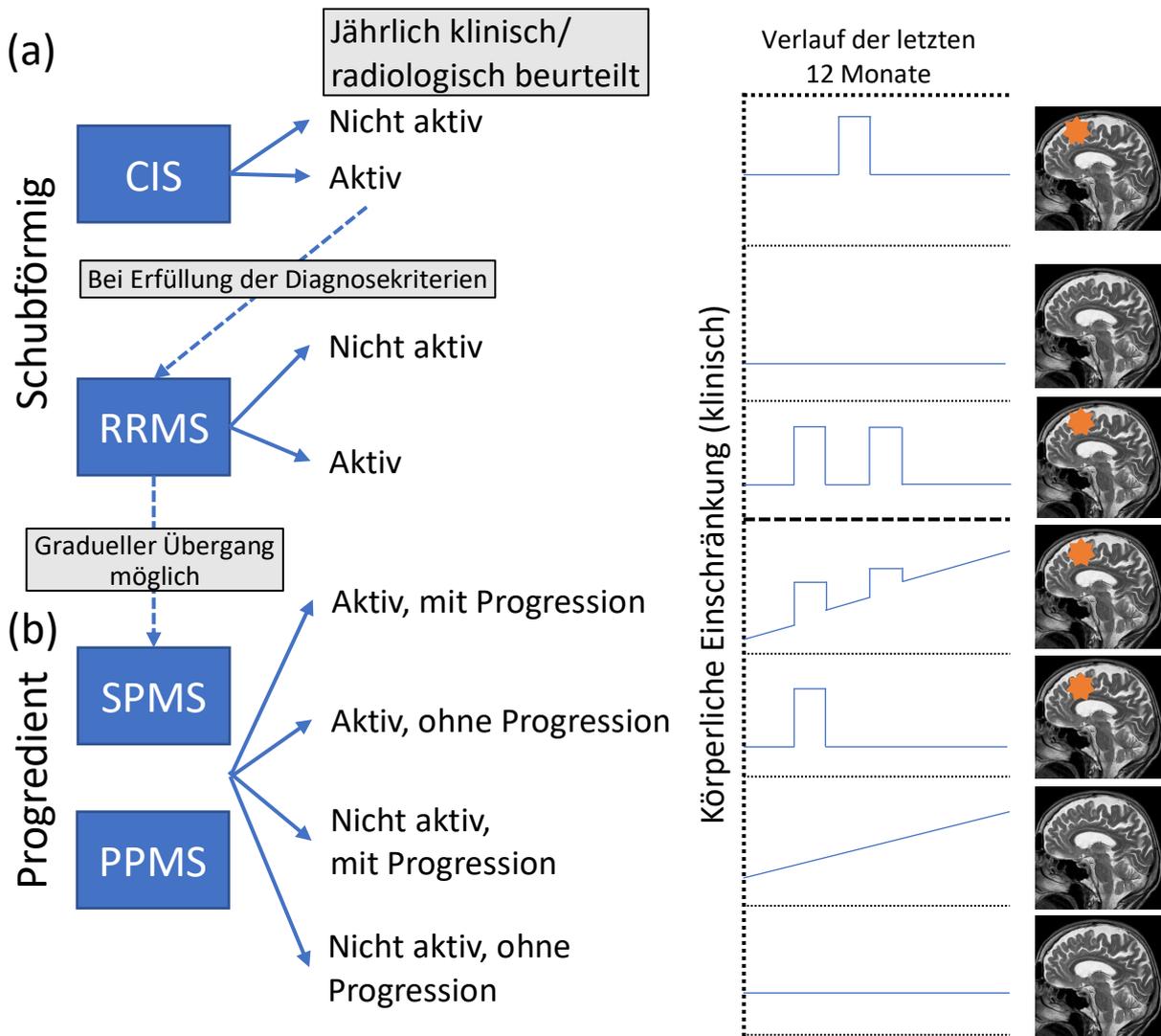


Abbildung 1: Phänotypen bzw. klinische Verlaufsformen der MS (adaptiert von [15, 16]). Die Diagnosen in den blauen Kästen beruhen auf der medizinischen Geschichte und des Zustands des Patienten, wohingegen der Aktivitäts- und Progressionsgrad jährlich evaluiert wird. (a) zeigt die schubförmigen Subtypen CIS und RRMS. (b) zeigt die progredienten Subtypen SPMS (also einer RRMS folgend) und PPMS (also ohne vorhergehenden schubförmigen Verlauf). Der orangene Stern zeigt eine radiologisch gesicherte Aktivität (vergrößerte T2-Läsion oder Gadolinium-positive Läsion) an.

1.1.3. Pathologie

Bei der MS kommt es immer wieder zu Entzündungsherden (auch Läsionen genannt), die in verschiedene Läsionstypen unterschieden werden können. Diese treten sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz auf; für eine tiefergehende Auseinandersetzung empfehle ich folgende Übersichtsarbeiten: [17, 18]. Ich werde im folgenden Absatz einige aktive Läsionstypen der weißen Substanz beschreiben, die mutmaßlich die häufigsten (Erst-)Symptome (siehe Tabelle 1) bedingen.

Die histopathologischen Kennzeichen einer aktiven demyelinisierenden Läsion, und somit des akuten Schubes, sind schon lange bekannt: Eine verminderte Dichte myelinisierter Fasern der weißen Substanz, periphere Immunzellrekrutierung mit in Phagosomen angereicherten Myelinproteinen in Makrophagen/Mikrogliazellen und axonaler Schaden [19, 20]. Lucchinetti und Kollegen [19] beschreiben

auf dieser Grundlage eine Heterogenität der aktiven Läsionen in Biopsien bzw. Autopsien und definieren vier verschiedene Typen: Typ 1- und Typ 2-Läsionen weisen vorwiegend eine T-Lymphozyten- und Makrophagen-vermittelte Inflammation mit zentrifugaler Demyelinisierung um zentrale Venolen/Venen auf, welche große Ähnlichkeit mit einer autoimmunen Enzephalomyelitis zeigt. Typ 2-Läsionen zeigen im Unterschied zu Typ 1-Läsionen deutliche Immunglobulin- und Komplement C9neo Antigen-Ablagerungen. Bei Typ 3-Läsionen zeigt sich eine Oligodendrozytenapoptose, schwer abgrenzbare Ränder der aktiven Läsionen und eine blutgefäßunabhängige-Demyelinisierung; dieser Läsionstyp ist höchstwahrscheinlich mit einer läsionsauslösenden funktionalen Beeinträchtigung der Oligodendrozyten erklärbar. Typ 4-Läsionen treten in der Untersuchung nur in PPMS-Fällen auf und zeigen Ähnlichkeiten zu Typ 1- und Typ 2-Läsionen. Der massive Verlust an Oligodendrozyten und die fragmentierte DNA in der umliegenden weißen Substanz legen auch hier eine primäre Oligodendrozytendapoptose nahe.

1.1.4. Ätiologie

Bis heute ist die genaue Ätiologie der MS ungeklärt. Vermutlich ist sie multifaktoriell bedingt [21] und genetische als auch Umweltfaktoren sowie deren Interaktion spielen eine kausale Rolle [8, 22]. Untersuchungen mit eineiigen Zwillingen zeigen eine Konkordanz von 30% [21], wobei eine hohe Varianz der Konkordanz in verschiedenen Population (vermutlich bedingt durch Umweltfaktoren) beobachtet wird [23]. Bei MS-Patienten sind mehr als 200 DNA-Polymorphismen bekannt, die jedoch alle Normvarianten darstellen. Die gewichtigste MS-assoziierte Gen-Variante *HLA DRB15:01* mit einer Verdreifachung des Erkrankungsrisikos trägt 25-30% der Bevölkerung in Nordeuropa und der USA in sich [24]. Migrationsstudien (von niedrig-zu-hoch-Risikogebieten und von hoch-zu-niedrig-Risikogebieten) zeigen, dass Umweltfaktoren v.a. vor dem 15. Lebensjahr Einfluss auf das MS-Risiko nehmen [25, 26]. Eventuell verändert bereits eine intrauterine Exposition das Lebenszeitrisko: Neugeborene mit vermindertem Vitamin D-Spiegel im Blut haben ein erhöhtes MS-Erkrankungsrisiko [27]. Kinder von Müttern mit reduzierten Vitamin D-Serumspiegeln während der Schwangerschaft [28] sowie im Frühjahr geborene Kinder sind häufiger von MS betroffen [29]. Der stärkste Umweltfaktor ist neben einer Serumpositivität für Epstein-Barr-Viren (EBV) eine späte und meist symptomatische Primärinfektion mit EBV („infektiöse Mononukleose“) als junger Erwachsener [30] sowie das aktive und passive Rauchen [31].

Es gibt noch weitere Korrelationen mit Viren, der Ernährung, dem Gewicht in der Adoleszenz u.a., aber erst die Kombination von genetischer Prädisposition (z.B. *HLA DRB15:01*) und unspezifischen und verbreiteten Umweltfaktoren steigert das Risiko einer MS-Erkrankung bis um das 16-fache im Vergleich zu einem einzelnen Risikofaktor [24]. Bisher handelt es sich nur um Beobachtungen und kausale Ursachen konnten noch nicht bewiesen werden.

1.1.5. Therapie

Die Therapie des akuten Schubes erfolgt mit Glukokortikoiden mit dem Ziel der schnelleren Symptombesserung [8].

Seit Mitte der 1990er-Jahre gibt es erste spezifischere Medikamente für MS-Patienten: die sogenannte „verlaufsmodifizierende Therapie“ (engl.: *disease-modifying treatment* - DMT). Die bis heute eingesetzten β -Interferone (Jahr der Entdeckung bzw. Zulassung: 1993-1998), Glatirameracetat (2003), Teriflunomid (2013) und Dimethylfumarat (2014) werden als Ersttherapie bei milden bzw. moderaten Verläufen eingesetzt [8]. Bei (hoch-) aktiven Verläufen werden neuere Eskalationstherapeutika eingesetzt, wie Natalizumab (2006), Fingolimod (2011), Alemtuzumab (2013), Cladribine (2017) und Ocrelizumab (2018) [8]. Dabei reduziert sich die Schubrate auf <30% mit Inkaufnahme einer potentiell etwas weniger sicheren Therapie und keiner erwiesenen deutlichen Besserung der Langzeitverschlechterung [32].

Ziel aller bisheriger Medikamente ist die Reduktion der Neuroinflammation, also die Abnahme der Schubrate. Die Datenlage zur Reduktion der Langzeitverschlechterung (also Neurodegeneration [9, 33-35]), welche von Relevanz für Patienten und Gesundheitsökonomie ist, ist uneinheitlich. Es gibt seit Einführung der DMT Langzeituntersuchungen, welche aufzeigen, dass der Grad der Behinderung unabhängig von der Anzahl der Schübe ist [14, 36-40] bzw. der Zusammenhang sehr schwach und ggf. nur abhängig von der Schubfrequenz der ersten zwei Jahre ist [41]. Eine schwedische Kohortenstudie mit DMT-Patienten zeigt, dass der gleiche Grad der Behinderung („Gehstrecke von 100 m nur mit Unterstützung möglich“, gemäß [engl.] *Expanded Disability Status Scale* [42]) nach vergleichbarer Zeit erreicht wird, wie in nicht therapierten Kohorten [12].

Für die letztendliche Beurteilung der DMT wird es nötig sein weiter prospektive Langzeituntersuchungen über Jahrzehnte durchzuführen, da die Zulassungsstudien meist Beobachtungszeiträume von maximal 2-5 Jahren nutzen und damit das Ausmaß der Neurodegeneration und langfristige Behinderungsgrade insbesondere bei Behandlung mit neueren Medikamenten kaum bekannt sind.

1.2. Physiologie der Oligodendrozyten

Oligodendrozyten gehören zu den Gliazellen, den sogenannten Stützzellen im ZNS. Sie befinden sich vorwiegend in der weißen Substanz, bilden die Myelinscheiden und myelinisieren ca. 20-50 internodale Myelinabschnitte mehrerer Axone [43]. Es gibt zwei Hauptfunktionen der Myelinscheiden: (1) Einerseits ermöglichen sie eine schnelle und energieeffiziente Weiterleitung von Aktionspotentialen im Axon, die sogenannte saltatorische Weiterleitung [44-46]. (2) Andererseits ermöglichen sie durch Ionenkanäle, Transporter und [engl.] *gap junctions* eine metabolische Kopplung mit dem Axon und dadurch dessen

dauerhafte Integrität [45-49]. Weitere Funktionen der Myelinscheiden sind die Gewährleistung der zellulären Ionen- und Wasserhomöostase [46] sowie des schnellen axonalen Transports [50-52].

Die Myelinscheiden machen das bis zu 100-fache des Zellgewichtes des Oligodendrozyten aus [53]. Dies führt zu einem hohen metabolischen Bedarf und damit einhergehend einer vermehrten Bildung von Wasserstoffperoxid und reaktiven Sauerstoffspezies [54]. Zudem haben Oligodendrozyten eine geringere Konzentration des antioxidativen Enzyms Glutathion als andere Zellen [53, 55]. Insgesamt erhöhen diese Faktoren die Vulnerabilität von Oligodendrozyten [53].

1.3. Pathogenese und die Rolle der Oligodendrozyten bei der MS

Die Pathogenese der MS ist vergleichbar ungeklärt wie die Ätiologie. Man kennt verschiedene Komponenten, aber noch nicht deren Zusammensetzung und Zusammenspiel [9]. Einig ist man sich, dass es zu einer Aktivierung von peripheren Immunzellen mit folgender ZNS-Invasion kommt [56] (Autoimmunitätskomponente), sowie zu einem Oligodendrozytenuntergang (Zytodegeneration) und einer Neurodegeneration (axonaler Schaden und neuronaler Untergang) [8]. Zwei Hypothesen beschreiben die mögliche Pathogenese der Erkrankung: Die Inside-Out- und die Outside-In-Hypothese [8, 21, 56, 57].

Die häufiger anerkannte Outside-In-Hypothese beschreibt die initiale Invasion autoreaktiver Lymphozyten in das ZNS [9]. Ursachen dieser Invasion könnten eine gestörte Regulation durch regulatorische Lymphozyten [58], eine Kreuzreaktivität zwischen viralen- und Autoantigenen [59, 60] oder ein starker inflammatorischer Stimulus, der Autoimmunität erleichtert [8, 61], sein.

Abbildung 2b zeigt schematisch eine mögliche Schädigung von Myelinscheiden durch humorale und zelluläre Immunmediatoren mit folgender zentripetaler Zytodegeneration und Demyelinisierung in aktiv demyelinisierenden Läsionen [62]. Eine zentripetale Zytodegeneration beschreibt eine distale Schädigung des Oligodendrozyten, die sich zentripetal (also zum Zellkörper hin) ausbreitet und zum Zelluntergang führt. Durch die Gewebsschädigung freigesetzte Antigene stimulieren fortlaufend die Autoimmunreaktion und dieser Kreislauf setzt sich fort (Abbildung 2a).

Die zunehmend bekannte Inside-Out-Hypothese [8, 21, 63] beschreibt eine initiale zentrale Zytodegeneration der Oligodendrozyten mit sekundärer Autoimmunreaktion. Hinweise darauf geben Untersuchungen, in welchen insbesondere in sehr frühen MS-Läsionen (<2 Monate Krankheitsdauer) vorwiegend die oben beschriebenen Typ 3-Läsionen auftraten [19, 64]. Man beobachtete einen Oligodendrozyten- und Myelinverlust mit wenigen Lymphozyten und Makrophagen sowie eine Reduktion von Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG). Da es mutmaßlich erst in einem zweiten Schritt zu einer massiven Lymphozyteninvasion kommt, könnte man diese Typ 3-Läsionen auch als sogenannte

Einleitung

präaktive Läsionen (engl.: *preactive lesion*) bezeichnen [17]. MAG ist vorwiegend an der innersten Myelinscheide (also am distalsten Bereich des Oligodendrozytenfortsatzes) lokalisiert [65] und MAG-deletierte Tiere weisen distale Veränderungen der Myelinscheiden auf [66], vergleichbar mit Veränderungen der Myelinscheide in frühen MS-Fällen [19, 64, 67-69]. Dieser distalste Teil von Oligodendrozyten ist für humorale/zelluläre Immunmediatoren nicht direkt zugänglich (auch am Ranvier'schen Schnürring sind die distalsten Bereiche innenliegend und somit nicht direkt zugänglich[45]), ist aber am empfänglichsten für Auswirkungen von Zellschäden (siehe Abbildung 2c; sogenannte [engl.] *dying-back oligodendrogliaopathy*) [53, 70]. Biopsien in MS-Patienten von läsionsfernen Arealen ohne maximale Inflammation und Makrophageninfiltration zeigen bereits Myelindegeneration, ein Hinweis auf vorangehende Demyelinisierung auch ohne Inflammation [68]. Diese Beobachtung ist vereinbar mit der Inside-Out-Hypothese. Die durch Zytodegeneration freigesetzten Myelinbestandteile wirken dann hochgradig immunogen (z.B. zitrulliniertes basisches Myelinprotein [engl.: *myelin basic protein* – MBP] [71] und Myelinfette [72]) [57] und bewirken eine sekundäre Immunreaktion mit massiver Lymphozyteninvasion [63, 73-75]. Wie auch bei der Outside-In-Hypothese kommt es durch die Immunreaktion zur Freisetzung weiterer Antigene und einer verstärkten Autoimmunreaktion – dieser Kreislauf setzt sich fort (Abbildung 2a).

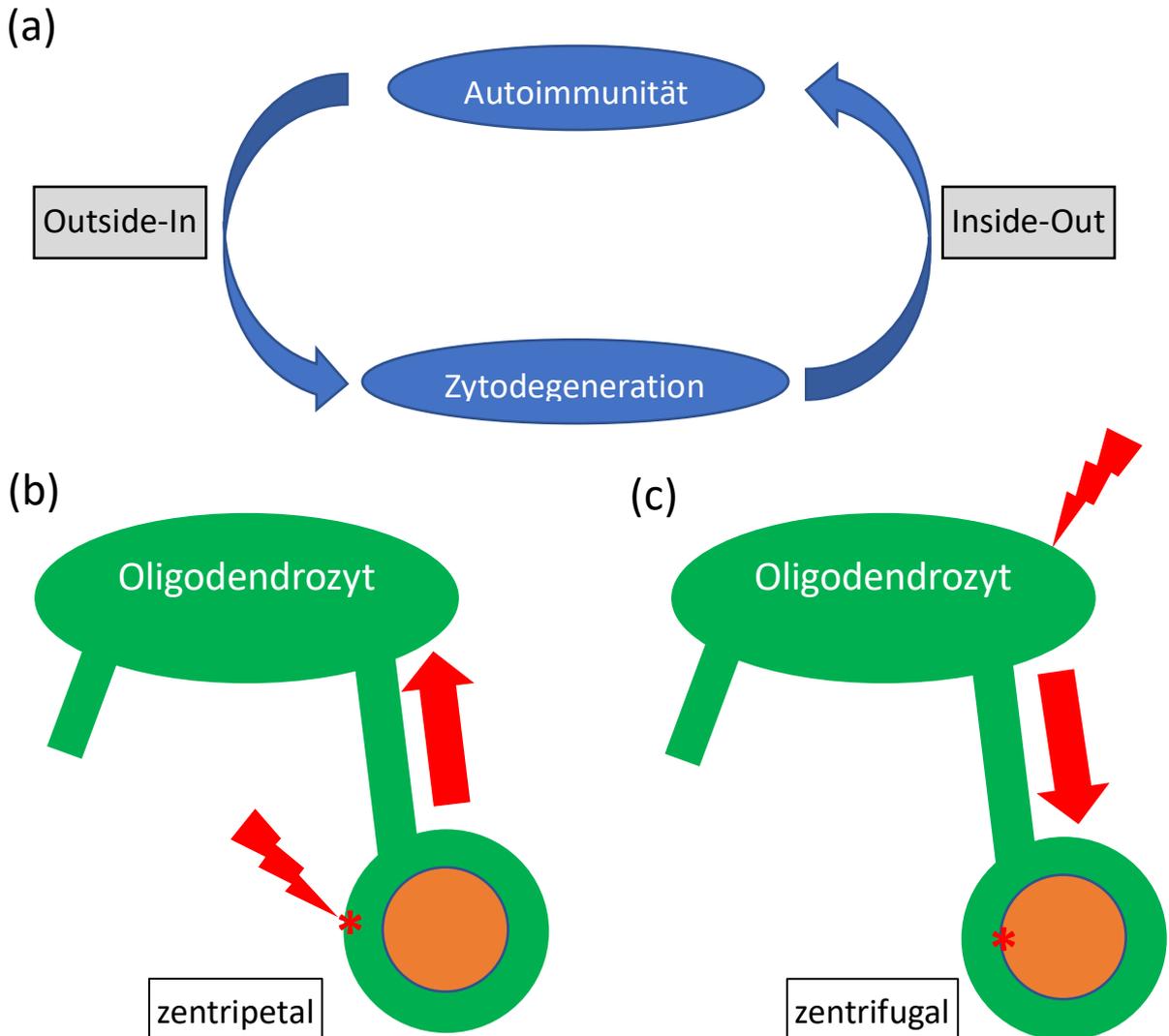


Abbildung 2: Hypothesen zur Pathogenese der MS. (a) zeigt die zwei vorherrschenden Hypothesen der Initiierung der Erkrankung: Die primäre Autoimmunität (Outside-In) versus die sekundäre Autoimmunität durch eine primäre Zytodegeneration (Inside-Out). Adaptiert von Stys und Kollegen [57]. (b) und (c) zeigen schematisch zwei Möglichkeiten der Oligodendrozytenschädigung. (b) stellt eine initiale periphere oberflächliche Schädigung dar (z.B. durch Antikörper) mit der Folge eines zentripetalen Schädigungsmusters des Oligodendrozyten. (c) zeigt eine zentrale Oligodendrozytenschädigung (z.B. durch mitochondrialen Stress) und infolgedessen eine zentrifugale Ausbreitung der Schädigung: Die morphologische Schädigung ist erstmalig am distalsten Ende des Oligodendrozyts erkennbar, der innersten Myelinscheide. Der rote Stern zeigt jeweils den Ort der morphologischen Schädigung an.

Die Besonderheit der Heterogenität der MS lässt sich durch die Inside-Out-Hypothese erklären [57]: Während der zytodegenerative Prozess kontinuierlich im Hintergrund (v.a. zu Beginn) verläuft wird die Erkrankung initial nur dann klinisch auffällig, wenn es zu einer deutlichen Immunreaktion (Schub, daher RRMS) kommt [75]. Bei der PPMS wäre die zugrundeliegende Immunaktivität eher schwach ausgeprägt, sodass die Zytodegeneration kontinuierlich fortschreitet und ab einem gewissen Schädigungsgrad klinisch auffällig wird und sich dann zunehmend verschlechtert. Nachdem die Immunaktivität mit zunehmenden Alter nachlässt (Immunseneszenz) [76] wird aus der RRMS eine SPMS mit vergleichbarem Verlauf wie die PPMS [37, 77]. Hinweise für eine vor der klinischen Manifestation im Hintergrund ablaufende Zytodegeneration erbringt eine norwegische prospektive Untersuchung [78]. Hierbei zeigt

sich eine Korrelation zwischen einer verminderten kognitiven Leistung in der Einberufungsprüfung und dem gehäuften Auftreten von RRMS (innerhalb von 2 Jahren) bzw. PPMS (innerhalb von 20 Jahren).

Die Folge der Demyelinisierung bzw. Zytodegeneration ist die Neurodegeneration, also ein Verlust von Axonen und Neuronen. Der Axonverlust ist der Hauptgrund für die irreversible Behinderung von MS-Patienten [35, 79, 80]. Gründe für die Neurodegeneration liegen in der fehlenden trophischen Unterstützung der Axone durch das Myelin [47, 81] und mitochondrialer Dysfunktion [79, 82] im Axon selbst [8].

Es ist weiterhin unklar, weswegen es initial zu einer Zytodegeneration der Oligodendrozyten kommt. In präaktiven Läsionen findet man großflächig metabolisch gestresste Oligodendrozyten [83-85]. Oligodendrozytärer Stress bzw. Schaden führt zu Stress im endoplasmatischen Retikulum mit folgender Demyelinisierung [86]. Gründe für den oligodendrozytären Schaden können vielzählig sein: (1) Oxidativer Stress und vermehrte reaktive Sauerstoffspezies [53] z.B. durch chemisch induzierte Hypoxie [87] oder durch Mutationen im mitochondrialen Genom und damit beeinträchtigter mitochondrialer Funktion [83, 88]. In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigen Untersuchungen eine verminderte mitochondriale Dichte in MS-Gewebe [89, 90]. (2) Vermehrte reaktive Sauerstoffspezies durch proinflammatorische Zytokine, welche im Rahmen einer Inflammation von Mikrogliazellen freigesetzt werden [87, 91, 92]. (3) Geringgradige Oligodendrozytenschäden z.B. durch gehäufte Gehirnerschütterungen in der Jugend, welche zu einem erhöhten MS-Risiko führen [93].

1.4. Toxisches Demyelinisierungs-Tiermodell: Cuprizone

Bis heute gibt es nicht das eine, allumfassende MS-Mausmodell. Aus diesem Grund nutzt man für die verschiedenen Aspekte der Krankheit unterschiedliche Tiermodelle. Das am häufigsten verwendete Modell ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, bei welcher durch die subkutane Gabe von Myelinbestandteilen und einem starken Immunstimulator eine Immunantwort mit Antikörperbildung gegen Myelin und eine Demyelinisierung erfolgt. Es gibt jedoch keinerlei Beweise, dass dieser Mechanismus auslösend für die MS ist.

Da ich mich in der folgenden Arbeit auf die zytodegenerativen Aspekte der MS fokussiere, nutzten wir ein toxisches, T-Zell- und Antikörper-unabhängiges Tiermodell – das sogenannte Cuprizone-Modell. Bei Cuprizone (bis-cyclohexanone-oxaldihydrzone) handelt es sich um einen Kupferchelator, welcher eine sehr reproduzierbare Demyelinisierung in verschiedenen Gehirnregionen hervorruft [94]. Erste Experimente erfolgten 1966 und doch ist die genaue Wirkweise bis heute unbekannt [94, 95]. In den Leberzellen beobachtet man eine Cuprizone-induzierte mitochondriale Dysfunktion, weswegen man die Demyelinisierung auf Störungen der mitochondrialen Atmungskette in Oligodendrozyten zurückführt [94]. Ob dies aufgrund eines Kupfer-Mangels [96] oder einer Störung des Eisenmetabolismus erfolgt, ist

unklar [97]. Oligodendrozyten sind mutmaßlich aufgrund der hohen metabolischen Anforderung zur Unterhaltung des Myelins besonders vulnerabel für oxidativen Stress durch Störungen der Atmungskette [20, 53, 95]. Zellulärer Stress von Oligodendrozyten sieht man bereits nach 2-tägiger Cuprizone-Behandlung [98]. Nach ca. 3 Wochen beginnt die Demyelinisierung und ist nach ca. 4-5 Wochen im Corpus callosum (CC) und anderen Zielregionen [20] vollständig. Die Cuprizone-induzierten Läsionen weisen große Ähnlichkeit zu den von Lucchinetti und Kollegen beschriebenen Typ 3-Läsionen [19] auf: (1) aktiv demyelinisierende Läsionen mit kaum T-Zellen aber vielen Mikroglia/Makrophagen, (2) Hinweise auf metabolischen Stress und mitochondriale Defizite, (3) Herunterregulation der MAG mRNA Expression und (4) schlecht definierte Läsionsgrenzen, welche nicht von einer Vene/Venole zentriert sind [95].

Untersuchungen zeigen, dass bereits frühe Oligodendrozytenschädigungen (bei geringer Demyelinisierung) ausreichen, um bei hoher Immunstimulation eine ZNS-Invasion von Immunzellen zu verursachen [73, 99] und dadurch eine inflammatorische Demyelinisierung ermöglicht wird [63, 73, 75, 99].

1.5. Dreidimensionale ultrastrukturelle Untersuchung

Da es sowohl bei MS-Patienten, als auch in Cuprizone-Läsionen initial zu Veränderungen am distalsten Abschnitt von Oligodendrozyten kommt [19, 67, 68] und wir diese genauer untersuchten, nutzten wir zur ultrastrukturellen Analyse die sogenannte 3D-EM-Technologie (engl.: *serial block-face scanning electron microscopy* für „serielle Rasterelektronenmikroskopie“). Diese Methodik erlaubt hochauflösende ultrastrukturelle Untersuchungen kleiner Strukturen in allen drei Raumebenen (genauerer siehe Seite 36).

1.6. Fragestellung

Bis zum heutigen Tag gibt es keine eindeutige Aussage über die Ätiologie und Pathogenese einer Erkrankung, die deutschlandweit schätzungsweise 240.000 Menschen betrifft [7, 100] – die Multiple Sklerose.

Für neuere und wirksamere Therapien braucht es ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathogenese. Die bei der MS beschriebene primäre, metabolisch-induzierte Oligodendrozytendegeneration (Oligodendrogliepathie) ist bisher, insbesondere ultrastrukturell, noch nicht ausreichend untersucht worden.

Die Fragestellung meiner Arbeit war daher die Untersuchung und Charakterisierung der primären metabolisch-induzierten Oligodendrogliepathie in vitro und in vivo. Ein Ziel war der Nachweis und die Beschreibung inflammationsunabhängiger mikroskopischer, elektrophysiologischer sowie ultrastruktureller Veränderungen – auch im zeitlichen Verlauf. Ein weiteres Ziel war es eine mögliche Reversibilität der Folgen einer metabolischen Stressreaktion nachzuweisen.

Durch ein besseres Verständnis der primären Oligodendrogliepathie kann man möglicherweise auch die MS besser verstehen und zielgerichtetere Therapien für die frühen, sowie die progressiven Phasen der Erkrankung entwickeln.

2. Material

2.1. Geräte, Verbrauchsgegenstände und Programme

2.1.1. Geräte

Gerät	Details	Firma	Bestellnummer
Aufrechtes Mikroskop	FN-1	FN-1, Nikon, Japan	
Ausgießstation	Microm EC 350-2	ThermoScientific, Walldorf, DE	
Eppendorf Pipetten			
Extrazellulärer Verstärker	EXT-10-2F	NPI electronic	
Feinwaage	R200D	Sartorius, Göttingen, DE	
Hamamatsu - Kamera	Orca Flash 4.0		C1144022CU
Inkubator ZK	Queue Stabil Therm	Nunc, Wiesbaden-Biebrich, DE	
Konfokales Mikroskop (DSU)	Olympus BX51WI mit Olympus BX-DSU und SOLA LED Lampe	Olympus, Hamburg, Deutschland (DE)	
Kühlschränke	CNP 3913 Index 21C/001 Premium Gefrierschrank Slimline (Dixell) – 3°C	Liebherr	30.668.024.1
Leica DMI8		Leica	
Leica vibratome	VT1200S	Leica, Wetzlar, DE	
Magnetrührer	Combimag RET	IKA, Staufen, DE	
Mikroskop	Nikon Eclipse 50i, Digital Sight DS-2Mv	Nikon, Amsterdam, Niederlande	
Mikrowelle	Microwave oven	Exquisit	
Oko Touch		Oko Lab	1258
Rotationsschüttler	IKA-Schüttler MTS4		
Schnittmikrotom	Leica SM2000R- Schlittenmikrotom	Leica Biosystems, Wetzlar, DE	SM200R

Material

Gerät	Details	Firma	Bestellnummer
SteriBank ZK	Hera Safe	Unity Lab Services (thermo fisher)	
Stimulator, A-M Systeme	Model 2100	Science Products, DE	
TEM	Zeiss EM-10	Zeiss, Oberkochen, DE	
Ultracut E	Reichert-Jung	Leica, Wetzlar, DE	
Ultramikrotome		Leica, Wetzlar, DE	
Vertikaler Puller	Model PC10	Narishige, Japan	
Wasser-Streckbad	Leica HI1210	Leica, Wetzlar, DE	
WMF Mixer	Kult X	WMF Group, Geislingen an der Steige, DE	

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte

2.1.2. Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstand	Details	Firma	Bestellnummer
B. Braun Omnifix®	Spritze 20 ml	Braun, Mainz, DE	4616200F
Luer	Spritze 50 ml		22050
Bechergläser	1000 ml	VWR, Darmstadt, DE	213-1111
Bienenwachs	Gelb: Rein natürlich	Roth, Karlsruhe, DE	5830.1
Borosilikat-Glaskapillaren		Science Products, DE	
Cuprizone	Bis-Cyclohexanone, Oxaldihydrazone	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE	C9012
Einbettkassette mit Deckel	Megakassetten, weiß	Medite, Burgdorf, DE	47-1150-00
Einbettkästchen ohne Deckel		VWR, Darmstadt, DE	1387-4901
Einstreu	Abedd Espe Classic; 2,5 mm 190g/L [LtE E-001]	Abedd, Wien, Österreich	H1505-30
Eppendorf Spitzen	0,1-20 µl 2-200 µl 50-1000 µl	VWR, Darmstadt, DE	22492012 30000870 30000919
Eppendorf Tubes	1,5 ml Eppendorf	VWR, Darmstadt, DE	30.120.086

Material

Verbrauchsgegenstand	Details	Firma	Bestellnummer
	2,0 ml Eppendorf		30.120.094
Falcon-Röhrchen	Rotilabo®-Zentrifugenröhrchen, ohne Stehrand, mit Beschriftungsfeld	Roth, Karlsruhe, DE	N463.1
Filterpapier	Ø240 mm	Schleicher & Schuell, Düren, DE	594 1/2
Haltungsfutter	Extrudat, ca. 16 mm	Ssniff, Soest, DE	V1126-000
ImmEdge™		Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	H4000
Immersionsöl	Für Mikroskopie, nicht fluoreszierend, Brechungsindex bei 23°C = 1,518	Olympus, Hamburg, DE	
Maushäuschen	Mäuse Iglu Rot, Polycarbonat	Tecniplast, Hohenpeißenberg, DE	13100
Molekularsieb	3 Å (0,3nm)	Roth, Karlsruhe, DE	8487.2
Nadeln	27Gx3/4; 0,4x20 mm	Terumo, Eschborn, DE	NN-2719R
Nest	Nestlets 5 x 5 cm	Zoonlab, Castrop-Rauxel, DE	3097055
Objektträger	SuperFrost® Plus	VWR, Darmstadt, DE	631-0108
OP-Besteck	Schere, Pinzette, Stecknadeln		
Paraplast		Leica, Richmond, IL, USA	39602012
Petrischalen	Gamma-sterilisiert, ohne Belüftungsnocken, Ø94 mm, Höhe 16 mm	Roth, Karlsruhe, DE	EN16.1
Pulverfutter (Mehl, SM R/M)	Kontrolle ohne Substanz, SM Ratte/Maus, Control/Placebo	Ssniff, Soest, DE	V1530-000
Rotilabo®-Magnetstäbchen		Roth, Karlsruhe, DE	1292-2
Safety- Multifly-Kanüle	20 G 200 mm lang	Sarstedt, Nümbrecht, DE	851.637.235

Material

Verbrauchsgegenstand	Details	Firma	Bestellnummer
Schottflaschen	1000 ml bzw. 2000 ml	VWR, Darmstadt, DE	215-1557
	Enghalsflasche mit Schraubverschluss		215-1558
Spritze	1 ml	Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, DE	
Tränkeflaschen	Gesamtvolumen 300 ml, Polysufon	Tecniplast, Hohenpeißenberg, DE	ACBT0262SU
Trichter	Ø250 mm	VWR, Darmstadt, DE	221-1730
Versuchskäfig	BlueLine, IVC-1285L, mit Haube und Gitter	Tecniplast, Hohenpeißenberg, DE	1285L
Wäge Schälchen	46x46x8	VWR, Darmstadt DE	611-9178
Zellmediumflasche Cellstar	250 ml, 75 cm ² , PS, Standard-Schraubverschluss Rot, Transparent, Steril	Greiner Bio One International GmbH, Frickenhausen, DE	658170
µ-Slide 8 well	Poly-L-Lysin beschichtet	Ibidi, Martinsried, DE	80824

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsgegenstände

2.1.3. Programme

Programm	Version	Hersteller
GraphPadPrism	5.04	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
	8.2.0	
Igor Pro	6.3	Wave Metrics, Lake Oswego, USA
ImageJ	1.51u	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Leica Application Suite X	3.4.1.17822	
Microsoft® Excel 2016 MSO	16.0.4738.1000	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft® Word für Mac	16.39	Microsoft, Redmond, WA, USA
Reconstruct	1.1.0.0.	BU, Boston, MA, USA
Recording-artist		Rick Gerkin, Arizona State University, USA

Tabelle 4: Liste der verwendeten Programme

2.2. Chemikalien, Seren, Puffer, Lösungen

2.2.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
1,2-Propylenoxid	Merck Millipore, Darmstadt, DE	807027.0100
Araldit CY-212	Serva, Heidelberg, DE	13824
Beschleuniger: 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	Serva, Heidelberg, DE	36975
BisBenzimide H 33258	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE	14530
DDSA (Dodecenylsuccinic acid anhydride)	Serva, Heidelberg, DE	20755
di-Natriumtetraborat	Merck, Darmstadt, DE	106308
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄ * 2 H₂O)	Merck Millipore, Darmstadt, DE	1.06580.1000
Dulbecco PBS (DPBS, Ca²⁺ und Mg²⁺ frei)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	21600010
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	41966
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ · 2 H₂O)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE	03685
Ethanol 100%	Merck Millipore, Darmstadt, DE	100983
Fluor Preserve Reagent	Calbiochem, San Diego, CA, USA	345787-25ml
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe, DE	CP10.2
Gentamicin (10 mg/ml)	Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, CA, USA	15710049
Glutardialdehyd (25%)	Merck Millipore, Darmstadt, DE	1.0439.0250
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Merck Millipore, Darmstadt, DE	1.04873.1000
Ketamin 10%	Medistar, Ascheberg, DE	
L-Thyroxin (3,2 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE	T1775
N2 - Supplement	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	17502048
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄ * H₂O)	Merck Millipore, Darmstadt, DE	1.06346.1000
Natriumhydroxid (NaOH) – 1N	Merck Millipore, Darmstadt, DE	1.09137.1000
Osmiumtetroxid	PAESEL+LOREI GmbH, Reinberg, DE	08-100-320

Material

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
Paraffin	Merck, Darmstadt, DE	K46815058603
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Millipore, Darmstadt, DE	1.04005.1000
Phosphatpufferlösung (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Biochrom, Merck, Darmstadt, DE	L-182-50
Saccharose	Merck Millipore, Darmstadt, DE	1.07653.1000
Salzsäure (Chlorwasserstofflösung – HCl)	Merck Millipore, Darmstadt, DE	109057
Tetradotozin-Citrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE	
Toluidinblau O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE	T3260-25g
Tri-Iodo-Thyronin (500 μM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE	T6397
Tris (PUFFERAN®) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Roth, Karlsruhe, DE	4855.2
TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	12604039
Xylazin 2%	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, DE	
Xylol	VWR Chemicals, Darmstadt, DE	28975.462
Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Roth, Karlsruhe, DE	X863.2

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien

2.2.2. Seren

Serum	Hersteller	Bestellnummer
Fetales Rinder Serum (FBS)	Hooke Laboratories Inc., Lawrence, MA, USA	SZ-0101 (100ml) Lot # 0101
Horse Serum	Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, CA, USA	16050-122
Normal Donkey Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE	D9663 α

Tabelle 6: Liste der verwendeten Seren

2.2.3. Puffer und Lösungen

2.2.3.1. Sato + 2% Horse Serum (München) – Lösung

Folgende Chemikalien wurden für einen Ansatz von 1 l gemischt:

- 978 ml DMEM
- 10 ml N2-Supplement
- 1 ml Tri-Iodo-Thyronin
- 160 μl L-Thyroxin

Material

- 500 µl Gentamicin
- 20 ml Horse Serum

2.2.3.2. Perfusionslösung für die Immunhistochemie

Die nötige Lösungsmenge pro Tier betrug ca. 200 ml.

Die Herstellung einer 3,7% Formalinlösung von 1 l erfolgte mit:

- 900 ml bidestilliertes Wasser
- 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 8,0 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
- 100 ml Formaldehyd 37%

Die beiden Natrium-Salze wurden im bidestillierten Wasser gemischt und Formaldehyd (37%) hinzugegeben, sodass eine 3,7% Formalinlösung entstand. Nun titrierte man den pH-Wert mittels NaOH auf 7,40, filtrierte die Gesamtlösung und kühlte die Perfusionslösung auf Eis.

2.2.3.3. Perfusionslösung für die Elektronenmikroskopie (Karnovski-Fixans)

Die nötige Lösungsmenge pro Tier betrug ca. 200 ml.

Folgende Lösungen wurden angesetzt:

0,1-molarer (M) Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4):

- Lösung A (sauer): 13,609 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) in 1000 ml bidestilliertem Wasser gelöst.
- Lösung B (alkalisch): 17,799 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml bidestilliertem Wasser gelöst.
- Zum Erreichen eines pH-Wertes von 7,4 nahmen wir 8 ml der Lösung A und 42 ml der Lösung B. Falls nötig: Genaueres pH-Wert-Einstellen mit Lösung A und B.

8% Paraformaldehydlösung: 25 ml frisch angesetzt:

- 2 g PFA in 25 ml warmen (60-70°) bidestilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Es entstand eine milchige Trübung.
- Klärung mit 1 M NaOH (1-3 Tropfen). Eine leichte Trübung kann bestehen bleiben.
- Lösung abgekühlt.

Mischung Karnovski Fixans:

- 25 ml PFA (8%)
- 10 ml Glutardialdehyd (25%)
- 15 ml Sörensen-Puffer (0,1 M)

2.2.3.4. *Einbett- und Färbelösungen für die Elektronenmikroskopie*

Waschpuffer für Einbettung:

- 100 ml Puffer (0,1M Sörensen-Puffer – gemäß 2.2.3.3) und 7,52 g Saccharose.

0,2 M Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4):

- Lösung A (sauer): 27,218 g KH_2PO_4 in 1000 ml bidestilliertem Wasser gelöst.
- Lösung B (alkalisch): 35,598 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml bidestilliertem Wasser gelöst.
- Zum Erreichen eines pH-Wertes von 7,4 nahmen wir 8 ml der Lösung A und 42 ml der Lösung B.
Falls nötig: Genaueres pH-Wert-Einstellen mit Lösung A und B.

1% Osmiumtetroxidlösung in Sörensen-Puffer (OsO_4):

- Stock: 2% wässrige Lösung in bidestilliertem Wasser angesetzt, dunkel und gut verschlossen im Schraubglas bei 4°C gelagert.
- Zur Verwendung 1:1 mit 0,2 M Sörensen-Puffer verdünnt.

Araldit-Mischung:

- 5,2 g Araldit
- 4,8 g DDSA
- 2% Beschleuniger

Toluidinblaufärbung für Semidünnschnitte:

- 1 g Toluidinblau O und 2,5 g di-Natriumtetraborat in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst.
- Die Lösung wurde filtriert.
- Die Lösung wurde 1:1 verdünnt.

2.2.3.5. *Lösungen für die Immunhistochemie*

PBS (10x):

- 477,5 g PBS-Pulver (für 50 l) in 4 l bidestilliertem Wasser gelöst.
- Mit bidestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt.

PBS (1x):

- 500 ml der PBS (10X)-Lösung und 4500 ml bidestilliertes Wasser gemischt.
- Mit Salzsäure pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Citrat:

- 10,5 g Zitronensäure in 4 l bidestilliertem Wasser gelöst.
- Mit bidestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt.
- pH-Wert eingestellt auf 6,0.

Tris-EDTA Puffer:

- 6,05 g Tris und 1,85 g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat in 4 l bidestilliertem Wasser gelöst.
- Mit bidestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt.
- pH-Wert eingestellt auf 9,0.

5% Normal donkey serum/PBS (Verdünnung 1:20):

- 2,5 ml Normal donkey serum und 47,5 ml PBS (1x) gemischt – 1 ml Aliquots bei -20°C

Hoechst 33258 - Stock A:

- 10 mg Bisbenzimid in 1 ml bidestilliertes Wasser gelöst.

Hoechst 33258 – Stock B: Verdünnung 1:1000 von Stock A

- 10 µg Bisbenzimid (1 µl Stock A) und 999 µl bidestilliertes Wasser gemischt.

Hoechst 33258 – Arbeitslösung (für 100 µl): Verdünnung 1:10.000 von Stock A

- 100 µl Stock B und 900 µl bidestilliertes Wasser gemischt.

2.2.3.6. Lösungen für die Compound Action Potential

N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) Lösung: pH 7,4; 310 mOsm

- 135 mM NMDG
- 1 mM Kaliumchlorid (KCl)
- 1,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
- 20 mM Choline Bikarbonat
- 10 mM Glukose
- 1,5 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂)
- 0,5 mM Calciumchlorid (CaCl₂)

Ringerlösung: pH 7,4; 300 mOsm

- 124 mM Natriumchlorid (NaCl)
- 3 mM KCl
- 1,25 mM NaH₂PO₄*H₂O
- 2 mM MgCl₂
- 2 mM CaCl₂
- 26 mM Natriumbikarbonat (NaHCO₃)
- 10 mM Glukose

2.3. Antikörper

Primärer Antikörper	Hersteller (Produktnummer)	Wirt	Klonalität	Konzentration	Antigen-Demaskierung
APC (CC1)	Calbiochem (OP80)	Maus	Monoklonal	1:100	Tris/EDTA
ATF3	Santa-Cruz (sc-188)	Kaninchen	Polyklonal	1:200	Tris/EDTA
OLIG2	Millipore (MABN50)	Maus	Monoklonal	1:100	Tris/EDTA
PLP	Abcam (ab183493)	Kaninchen	Monoklonal	1:1000	Tris/EDTA Citrat (Doppelfärbung mit SMI-312)
SMI312	Biologend (837904)	Maus	Monoklonal	1:250	Citrat

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper mit Konzentrationen und Herkunft

Sekundärer Antikörper	Hersteller (Produktnummer)	Wirt	Konzentration	Antigen-Demaskierung
AlexaFluor® donkey anti mouse 488	Life technologies (A21202)	Esel	1:200	Gemäß Primär-AK
AlexaFluor® donkey anti rabbit 594	Life technologies (A21207)	Esel	1:200	Gemäß Primär-AK

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper mit Konzentrationen und Herkunft

2.4. Tiere

Für die folgende Arbeit wurden 10-Wochen alte, 19-21 g schwere männliche C57BL/6 Mäuse von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Alle Tierversuche wurden gemäß § 8 TierSchG (Tierschutzgesetz) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Genehmigungsnummer: 55.2- 154-2532-73-15) und aktuell geltende Tierschutzbestimmungen eingehalten. Die Tiere wurden nach standardisierten Laborbedingungen (Tag-Nacht-Zyklus: 12 Stunden hell, 12 Stunden dunkel; kontrollierte Temperatur: 22°C ± 2 °C; Luftfeuchtigkeit 50% ± 10%, pathogenfreie Umgebung) gemäß der Organisation FELASA (engl.: *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) in gut belüfteten Käfigen (Grundfläche: 542 cm²) gehalten, die einmal wöchentlich gewechselt wurden. Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Nestbaumaterial und rote Häuschen waren vorhanden.

3. Methoden

3.1. Tierversuchsgruppen, Cuprizone-Gabe und Materialgewinnung

3.1.1. Tierexperimentelle Versuchsansätze

Es gab drei tierexperimentelle Versuchsansätze (Abbildung 3) für das Erreichen von Oligodendrozytenstress und einer toxischen Demyelinisierung: (1) Vier Tage Cuprizone-Intoxikation versus Kontrolle (n=4), (2) eine Woche Cuprizone-Intoxikation versus Kontrolle (IHC: n=4; TEM: n=3) und (3) drei Wochen Cuprizone-Intoxikation versus Kontrolle (IHC: n=5; 3D-EM: n=4; Elektrophysiologie: n=3).

Gruppen		Methoden
(1)	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 5px;">4 d Cup</div> <div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 5px;">Kontrolle</div> <div style="font-size: 2em; margin: 0 5px;">}</div> <div> <p>Transkardiale</p> <p>Perfusion</p> </div> </div>	→ IHC (n=4)
(2)	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 5px;">1 Woche Cup</div> <div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 5px;">Kontrolle</div> <div style="font-size: 2em; margin: 0 5px;">}</div> <div> <p>Transkardiale</p> <p>Perfusion</p> </div> </div>	<p>→ IHC (n=4)</p> <p>→ TEM (n=3)</p>
(3)	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 5px;">3 Wochen Cup</div> <div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 5px;">Kontrolle</div> <div style="font-size: 2em; margin: 0 5px;">}</div> <div> <p>Transkardiale</p> <p>Perfusion</p> </div> </div>	<p>→ IHC (n=5)</p> <p>→ 3D-EM (n=4)</p> <p>→ Elektrophysiologie (n=3)</p>

Abbildung 3: Tierversuchsgruppen und folgende Methoden. Abkürzungen: d [Tage]; Cup [Cuprizone]; n [Anzahl/Gruppe]; IHC [Immunhistochemie]; TEM [Transmissionselektronenmikroskopie]; 3D-EM [serielle Rasterelektronenmikroskopie].

3.1.2. Cuprizone-Zubereitung und -Verabreichung

Die Tiere erhielten ein 0,25%-Cuprizone-Futter-Gemisch (gemischt mit gemahlenem Nagetierfutter), welches täglich gemäß dem gleichen Protokoll angesetzt wurde. Das bei 4°C gelagerte Cuprizone wurde mit einem Plastiklöffel auf einer Feinwaage (in Gramm auf drei Nachkommastellen genau) abgewogen und in einer Konzentration von 0,25% mit dem gemahlenden Futter vermischt. Das Vermischen erfolgte im Tierstall unter einer desinfizierten Werkbank mit der WMF Küchenmaschine (eine Minute, niedrige Geschwindigkeit, händisch geschüttelt). Jeder Maus wurde ca. 20 g Cuprizone-Futter/Tag zur Verfügung gestellt (*ad libitum* - aufgeteilt auf zwei Plastikpetrischalen/Käfig).

3.1.3. Materialgewinnung

Am Versuchsende wurden die Tiere für die transkardiale Perfusion tief narkotisiert. Dies erfolgte intraperitoneal mit einer Ketamin-Xylazin-Lösung (Ketamin: 100 mg*kg⁻¹; Xylazin: 10 mg*kg⁻¹). Nach Kontrolle des Ausbleibens von Reflexen wurde das Tier transkardial perfundiert: Das Tier wurde in Rückenlage fixiert, der Thorax eröffnet, der rechte Vorhof aufgeschnitten und 20 ml eiskalte

Methoden

Phosphatpufferlösung (PBS) in den linken Ventrikel injiziert. Im weiteren Vorgehen unterscheidet sich die Perfusion für die Immunhistochemie und die Elektronenmikroskopie.

3.1.3.1. Fixierung, Einbettung und Schneiden für die Immunhistochemie

100 ml Perfusionslösung (gemäß Kapitel 2.2.3.1 zubereitet) wurden transkardial infundiert. Der Kopf wurde abgetrennt und die Kalotte mit einer feinen Schere vorsichtig eröffnet. Das Gewebe wurde für 24 Stunden in der Perfusionslösung bei 4°C inkubiert.

Das Gehirn wurde vorsichtig herauspräpariert und dann einzeln in Einbettkassetten in Leitungswasser gesammelt. Es wurde darauf geachtet, dass die Kassetten keine Luftblasen enthalten, da das Gewebe nicht (auch in den folgenden Schritten nicht) austrocknen durfte. Das Material wurde mindestens fünf Stunden unter fließendem Wasser gespült und anschließend über Nacht (bis zu Beginn des Einbettungsprotokolls) in 50% Ethanol gelagert. Alle folgenden Arbeitsschritte (bis auf Paraffin) erfolgten auf einem Rotationsschüttler. Die Dehydrierung und Paraffineinbettung erfolgte gemäß Tabelle 9.

Schritt	Chemikalie	Dauer [Minuten]
1	Ethanol 50%	Über Nacht
2	Ethanol 70% - I	40
3	Ethanol 70% - II	40
4	Ethanol 96% - I	40
5	Ethanol 96% - II	40
6	Ethanol 96% - III	40
7	Ethanol 100% - I	40
8	Ethanol 100% - II	60
9	Ethanol 100% - III	60
10	Xylol - I	40
11	Xylol - II	40
12	Xylol - III	40
13	Paraffin – I (61°C)	60
14	Paraffin – II (61°C)	60
15	Paraffin – III (61°C)	Mind. 2 ganze Tage

Tabelle 9: Dehydrierung und Paraffineinbettung der Gewebeproben für immunhistochemische Färbungen

Methoden

Das Einbetten des Gewebematerials erfolgte an der Ausgießstation. Hierbei orientierte man die Gehirne in den Formen so, dass eine frontale (koronare) Schnittführung möglich war. Die Paraffinblöcke konnten nach dem Abkühlen gelagert und jederzeit geschnitten werden.

Das Schneiden der Gewebsblöcke erfolgte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms mit einer Schnittdicke von 5 µm. Je zwei Schnitte wurden aus dem 48,5°C warmen Wasserbad auf einen Objektträger (OT) aufgezogen und auf einem Trockenständer bei Raumtemperatur für mindestens drei Stunden getrocknet. Zum weiteren Trocknen lagerten die Schnitte ca. 15 Stunden bei 48°C und konnten danach verwendet werden.

3.1.3.2. Fixierung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie

100 ml Perfusionslösung (gemäß Kapitel 2.2.3.3 zubereitet) wurden transkardial infundiert. Der Kopf wurde abgetrennt und die Kalotte mit einer feinen Schere geöffnet. Das Gewebe wurde für 24 Stunden in der Perfusionslösung bei 4°C inkubiert.

Das Gehirn wurde vorsichtig entnommen und ein keilförmiger, ca. 1 mm dicker Gewebeblock um das mediale CC heraus präpariert. Das Gewebe wurde einzeln in Einbettkassetten in Sörensen-Waschpuffer (gemäß Kapitel 2.2.3.4 zubereitet) gesammelt. Es wurde darauf geachtet, dass die Kassetten keine Luftblasen enthalten, sodass das Gewebe nicht (auch in den folgenden Schritten nicht) austrocknete. Die Einbettung erfolgte gemäß Tabelle 10. Die einzelnen Schritte erfolgten jeweils auf dem Schrägrührer.

Schritt	Chemikalie	Temperatur	Dauer und Häufigkeit	Weitere Informationen
1	Sörensen-Waschpuffer (pH 7,4)	4°C	3 x 20 min	
2	1%-Osmiumtetroxid-Lösung (gemäß 2.2.3.4)	4°C	120 min	Zur Kontrastierung und Nachfixierung
3	Sörensen-Waschpuffer (pH 7,4)	4°C	3 x 10 min	
4	Ethanol 50%	4°C	3 x 10 min	
5	Ethanol 70%	4°C	3 x 10 min	Lagerung über Nacht möglich
6	Ethanol 90%	Raumtemperatur (RT)	3 x 10 min	
7	Ethanol 96%	RT	3 x 10 min	
8	Ethanol 100%	RT	3 x 10 min	Mit Molekularsieb
9	Propylenoxid	RT	2 x 15 min	

Schritt	Chemikalie	Temperatur	Dauer und Häufigkeit	Weitere Informationen
10	Aralditgemisch (gemäß 2.2.3.4) 1:1 mit Propylenoxid	RT	Über Nacht	Über Nacht auf Schrägrührer im Abzug ohne Deckel: Propylenoxid dampft aus
11	Aralditgemisch	RT	6-7 h	Auf Schrägrührer im Abzug
12	Ausbetten in frisches Aralditgemisch	RT		In Silikonförmchen mit Nummer-Zetteln
13	Polymerisation	60°C	48 h	

Tabelle 10: Einbettprotokoll für die Elektronenmikroskopie. Abkürzungen: min [Minuten]; h [Stunden].

3.2. Immunhistochemie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunhistochemie genutzt, um Zielproteine (Antigene) in Gewebeproben zu detektieren und zu lokalisieren. Zur Detektion nutzten wir hochspezifische monoklonale oder polyklonale Antikörper (AK), die nur das Zielantigen binden und dadurch eine Markierung ermöglichen. Dieser Antigen-AK-Komplex wird durch einen Sekundär-AK detektiert, dessen F_{AB}-Bereich spezifisch den F_C-Bereich (siehe Abbildung 4, A) der Primär-AK bindet. Die Visualisierung erfolgt entweder durch eine chromogene Darstellung, bei welcher der Sekundär-AK an ein Enzym gebunden ist, das ein Substrat umwandelt und zur Farbreaktion führt oder durch mit Fluorochrom-markierte Sekundär-AK (siehe Abbildung 4, BI), welche durch die Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Der Vorteil der Zwei-Schritt-Methodik (im Gegensatz zu den mit Fluorochrom-markierten Primär-AK) liegt in der Amplifikation der Sekundär-AK am Primär-AK und einer damit einhergehenden Signalverstärkung und höheren Sensitivität.

Wir nutzten zudem eine Doppelfluoreszenz-Färbung, bei welcher zwei Antigene durch verschiedene hochspezifische Primär-AK markiert werden können (siehe Abbildung 4, BII). Man wählt Primär-AK mit unterschiedlichen F_C-Teilen (entweder aus verschiedenen Tiergruppen oder verschiedene Subtypen). Zur Unterscheidung benötigt man mehrere mit verschiedenen Fluorochromen markierte Sekundär-AK. Diese binden spezifisch an die verschiedenen F_C-Teile der Primär-AK. Damit war es uns möglich Kolokalisationen von Antigenen nachzuweisen. Zum Ausschluss einer unspezifischen Sekundär-AK-Bindung an den jeweils anderen Primär-AK inkubierten wir Schnitte mit einem Maus-Primär-AK und einem Anti-Kaninchen-Zweit-AK sowie einem Kaninchen-Primär-AK mit einem Anti-Maus-Zweit-AK. Zum Ausschluss einer unspezifischen Sekundär-AK Bindung an das Gewebe inkubierten wir dieses mit den einzelnen Sekundär-AK.

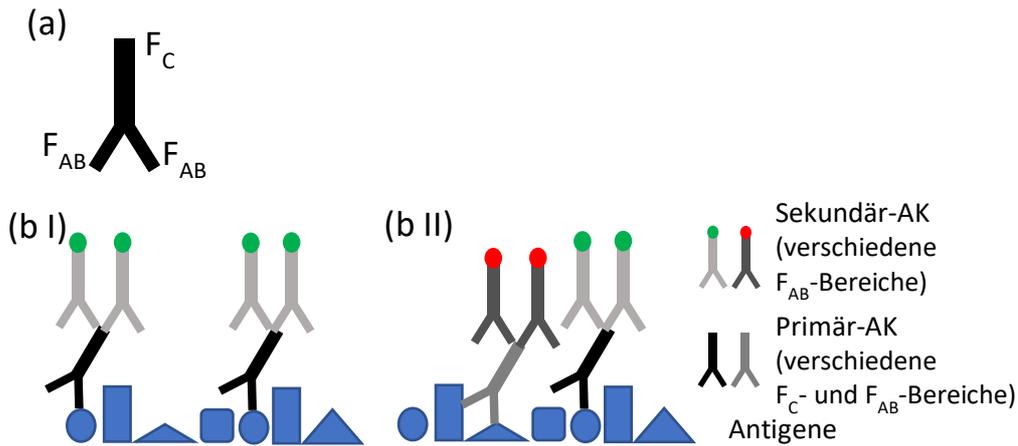


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Antigen-AK-Interaktion und AK-AK-Interaktion

3.2.1. Protokoll

Das folgende Protokoll beschreibt die Färbung mit Fluorochrom-markierten Sekundär-AK und wurde stets gleich verwendet, sodass standardisierte und vergleichbare Färbungen angefertigt werden konnten.

Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert (Tabelle 11, Schritt 1-3) und dann durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (Tabelle 11, Schritt 4-11).

Schritt	Chemikalie	Dauer [Minuten]
1	Xylol I	10
2	Xylol II	10
3	Xylol III	10
4	Xylol (50%) / Ethanol (50%)	5
5	Ethanol 100% I	3
6	Ethanol 100% II	3
7	Ethanol 96% I	3
8	Ethanol 96% II	3
9	Ethanol 70%	3
10	Ethanol 50%	3
11	Destilliertes Wasser	3

Tabelle 11: Entparaffinierung und Rehydrierung durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe

Beim Prozess der Formalin-Fixierung kommt es zwischen einigen Proteinen zu Bindungen, sogenannten [engl.] *cross-links*, welche die Interaktion einzelner Antigene mit dem Primär-AK verhindern bzw. abschwächen können (Abbildung 5, A). Es gibt verschiedene Herangehensweisen diese Antigene zu

demaskieren (je nach AK), wobei in der folgenden Arbeit die Hitze-induzierte Technik (HIER – engl.: *heat induced Epitope retrieval*) verwendet wurde. Hierbei ließen wir die Schnitte nach dem Aufkochen für zehn Minuten in einer Mikrowelle in Citrat (pH 6,0) oder Tris/EDTA (pH 9,0) kochen. Die Auswahl der Kochlösung ist AK-abhängig und wird bei einer Doppelfärbung so gewählt, dass beide Primär-AK bestmöglich an ihr Antigen binden können (Abbildung 5, B). Erst nach Abkühlen auf Raumtemperatur (ca. 15 Minuten durch Umspülen der Küvette mit Leitungswasser) folgte der nächste Schritt des dreimaligen Spülens auf einem Rotationsschüttler in PBS (1x – gemäß 2.2.3.5) für je fünf Minuten.

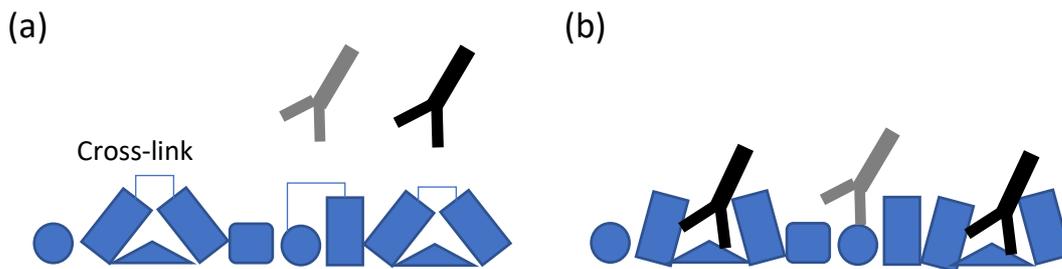


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der Demaskierung von Antigenen

Nach dem Spülen wurde um die Schnitte eine hydrophobe Barriere gezogen (ImmEdge™). Diese ermöglicht geringere Mengen von den verwendeten AK und eine bessere Färbequalität, da die aufpipettierten Lösungen eher auf dem Schnitt verbleiben.

Alle folgenden Schritte wurden während der Inkubationszeiten zur Vermeidung des Austrocknens von Schnitten in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Jeder Schritt einer Färbung soll das Endergebnis hoch-sensitiv und vor allem hoch-spezifisch markieren. Die Hauptursache einer unspezifischen, einheitlichen Hintergrundfärbung ist eine nicht-immunologische AK-Bindung (durch hydrophobe und elektrostatische Kräfte) an verschiedenen Lokalitäten im Gewebe. Zur Minimierung dessen, nutzten wir ein sogenanntes Blockierungsserum (5% - mit PBS verdünnt) aus dem Wirtstier des Sekundär-AKs. Die Spezifität der Primär- und Sekundär-AK werden dadurch deutlich erhöht. Die Schnitte wurden mit je 100 µl des 5%-Serums für 60 Minuten bei Raumtemperatur (26°C) inkubiert.

Das Blockierungsserum wurde abgeklopft und die Schnitte mit je 100 µl Immunserum (5% Blockierungsserum sowie Primär-AK in jeweiliger Konzentration (verwendete AK und Konzentrationen gemäß Tabelle 7) bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Immunserum abgeklopft und man spülte die OT anschließend dreimalig für je fünf Minuten in PBS auf einem Rotationsschüttler. Es folgte das Bedecken der Schnitte mit dem bzw. den (je nachdem, ob eine Einfach- oder Doppelfärbung durchgeführt wurde) Sekundär-AK, verdünnt mit 5% Blockierungsserum (verwendete AK und Konzentrationen gemäß Tabelle 8). Man

Methoden

benötigte 100 µl Immun-Serum (mit Sekundär-AK) und inkubierte die Schnitte anschließend für 60 Minuten bei 26°C. Bei der Verwendung von Fluorochrom-markierten Sekundär-AK wurden diese bei der Inkubation sowie allen folgenden Schritt soweit wie möglich vor Licht geschützt.

Das Serum wurde abgeklopft und die Schnitte erneut dreimalig für je fünf Minuten mit PBS auf einem Rotationsschüttler gespült. Der nächste Schritt dient der Kernfärbung mit Hoechst 33258 (bisBenzimide; 2'-(4-Hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi(1H-benzimidazole)trihydrochloride). Man bedeckte die Schnitte mit je 100 µl einer 1:10.000 Verdünnung (mit destilliertem Wasser) von Hoechst 33258 und inkubierte diese für 10 min bei 26°C.

Anschließend spülten wir die Schnitte zweimalig für je fünf Minuten in destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden mit FluorPreserve (so dünn wie möglich) eingedeckelt und zur optimalen Verteilung des Eindeckmittels über Nacht unter dem Abzug mit Gewichten beschwert. Am nächsten Tag versiegelten wir die Schnitte mit nicht-fluoreszierendem Nagellack, sodass das wasserbasierte Eindeckmittel nicht eintrocknete und Luftblasen entstanden.

In Tabelle 12 das stichwortartige Färbeprotokoll für die immunhistochemische Fluoreszenzfärbung.

Schritt	Protokoll
1	Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte gemäß Tabelle 11
2	Antigen-Demaskierung mittels HIER: 10-minütiges Kochen in Citrat oder Tris/EDTA (Tabelle 7)
3	Abkühlung auf Raumtemperatur, dann 3x5 min Spülen in PBS (auf Rüttelplatte)
4	Erstellung einer hydrophoben Barriere
5	1 h Inkubation mit 5%-Blockierungsserum (aus Wirtstier des Sekundär-AKs - Tabelle 8) bei 26°C
6	Serum abklopfen und Inkubation mit Primär-AK bei 4°C über Nacht (Konzentrationen gemäß Tabelle 7)
7	Lösung abklopfen, dann 3x5 min Spülen in PBS (auf Rüttelplatte)
8	Inkubation mit Sekundär-AK bei 26°C für 1 h (Konzentrationen gemäß Tabelle 8)
9	Lösung abklopfen, dann 3x5 min Spülen in PBS (auf Rüttelplatte)
10	Inkubation mit Hoechst 33258 bei 26°C für 10 min
11	Lösung abklopfen, dann 2x5 min Spülen in destilliertem Wasser (auf Rüttelplatte)
12	Schnitte dünn eindeckeln, über Nacht mit Gewichten beschweren, dann versiegeln

Tabelle 12: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen

3.2.2. Betrachtung und Digitalisierung der Schnitte

Bilder der Schnitte wurden unter einem Olympus BX51WI erstellt und digital gespeichert. Für die konfokale Betrachtung und Speicherung nutzen wir das Olympus BX51WI mit Olympus BX-DSU und der SOLA LED-Lampe.

3.3. Transmissionselektronenmikroskopie und Semidünnschnitte

Semidünnschnitte (1 μm dick) wurden mittels eines Ultracut E mit Glasmessern geschnitten und je zwei Schnitte auf einem OT platziert. Die Schnitte wurde bei 60°C auf einer Wärmeplatte erwärmt und dann 20 s – 120 s mit der Toluidinblau-Lösung (gemäß 2.2.3.4 zubereitet) gefärbt. Die Farblösung wurde mit bidestilliertem Wasser aus der Spritzflasche abgespült, als die Geweberänder sich grünlich zu verfärben begannen. Der OT stand noch kurz in einer Küvette mit bidestilliertem Wasser bevor er auf der Wärmeplatte (60°C) trocknete. Das Färbeergebnis zeigt alle elektronendichten Strukturen bläulich.

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erfolgte in Kooperation mit Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Petra Fallier-Becker (Abteilung Elektronenmikroskopie am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen). Die Ultradünnschnitte wurden mittels eines Leica Ultramikrotoms angefertigt und mit einem Zeiss EM-10 Transmissionselektronenmikroskop analysiert und digital gespeichert. Es wurden pro Tier (n=3) 16-20 zufällige Aufnahmen innerhalb des CC gemacht. Die Auswertung der Bilder erfolgte durch mich.

3.4. Serielle Rasterelektronenmikroskopie

Die Bilder des 3D-EM wurden durch die Firma *Renovo Neural, Incorporated* (Cleveland, Ohio, USA) angefertigt. Das Gewebe wurde gemäß Kapitel 3.1.3.2 fixiert, anschließend durch die Firma eingebettet und verarbeitet. Die Auswertung der Bilder erfolgte durch mich mit Hilfe der Software *Reconstruct* (BU, Boston, MA).

Diese Methodik ermöglicht hoch aufgelöste, räumlich hintereinanderliegende EM-Bilder. Jeder Schnitt hatte eine Dicke von 80 nm, sodass man auch von der Tiefenebene (Z-Ebene) Bildmaterial erhielt. Die Methodik ermöglicht das Verfolgen morphologischer Strukturen in allen drei Raumebenen und damit eine genauere Analyse der Morphologie.

Die Bilder hatten eine Breite und Höhe von 204,54 μm x 61,36 μm und eine Pixelskalierung von 0,0099874735 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$.

3.5. Elektrophysiologie: [engl.] *Compound action potential (CAP)*

Die CAP erfolgten in Kooperation mit Frau Dr. Friederike Pfeiffer am Werner Reichardt Centrum für integrative Neurowissenschaften (Universität Tübingen).

Die Mäuse wurden mit einer Mischung aus Isofluran (drei Volumen-%) und Sauerstoff anästhesiert und dekapitiert. Mit einem Leica VT1200 S Vibratom wurden in einer eiskalten NMDG-basierten und mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begasten Lösung (gemäß 2.2.3.6) 300-400 µm dicke koronare Hirnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in eine auf 32°C temperierte [engl.] *Haas-type interface* Inkubationskammer überführt, die mit Ringerlösung (gemäß 2.2.3.6), begast mit Carbogen, gespült wurde. Schrittweise wurden die Schnitte auf Raumtemperatur gekühlt, um diese zu equilibrieren.

Für den Versuch wurden einzelne Schnitte (je aus Region 265, nach Atlas von Sidman und Kollegen [101]) in ein aufrechtes Mikroskop transferiert. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur und ständiger Perfusion (ca. 2 ml/min) mit begaster Ringerlösung durchgeführt.

Messpipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren und mit einem vertikalen Puller zu einem Spitzendurchmesser von ca. 2-3 µm gezogen und mit Ringerlösung aufgezogen. Die Aufnahme- und Stimulationspipetten wurden in derselben Distanz von der Mittellinie (Gesamtdistanz ca. 1-1,4 mm – siehe Abbildung 6) in Faserbündel des kaudalen Teils des CC platziert.

Pro Durchlauf (Dauer zehn Sekunden) wurde ein Stimuluspaar appliziert (mit einem Interpuls-Intervall von 40 ms). Dabei dauerte jeder Stimulus je nach Einstellung 100-200 µs. Die Stimulus-Stärke wurde über einen separaten Stimulator reguliert und beginnend bei 50 V um jeweils 10 V bis 100 V gesteigert.

Die CAPs wurden von einem extrazellulären Verstärker (Hochpassfilter: 0,3 Hz, Tiefpassfilter 2 kHz, Sampling-Frequenz von 25 kHz) aufgenommen. Die Datenerhebung erfolgte mit dem Programm *Recording Artist*, genutzt mit *Igor Pro 6.3*. Negativkontrollen wurden stets nach Inkubation mit 0,5- 1 µM Tetrodotoxin-Citrat in Ringerlösung aufgenommen.

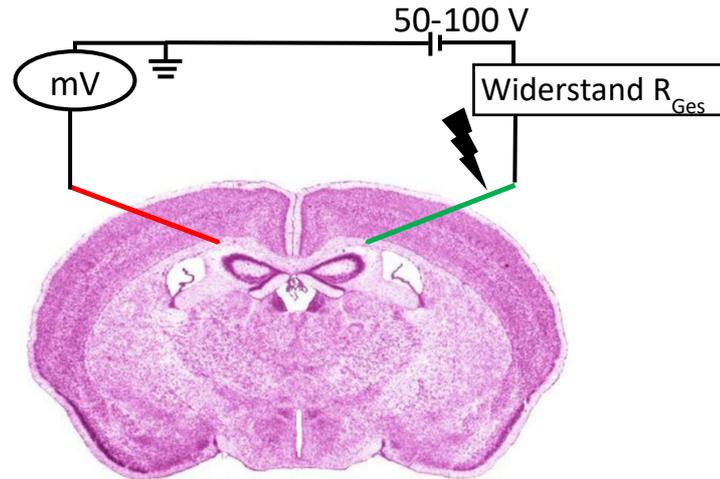


Abbildung 6: Schematische Vorgehensweise bei den CAP: Darstellung des groben Schaltkreises und Platzierung der Elektroden im medialen CC.

3.6. OliNeu-Kultur

Die Zellen, die von der Maus stammenden immortalisierten OliNeu-Zellreihe erhielten wir von Professor Jaqueline Trotter (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, DE). Diese wurden in einer 75 cm² Zellmediumflasche in modifiziertem SATO-Medium (gemäß 2.2.3.1) bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Dies erfolgte in einer H₂O-gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Nach dem Lösen mit TrypLE® und DPBS konnten die Versuche durchgeführt werden.

3.6.1. Live-cell imaging

Für Versuche mit dem [engl.] *live-cell imaging* Mikroskop wurden die OliNeu-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten 8-well-Platten ausgesät. Pro Well wurden ca. 5×10^4 Zellen in modifiziertem SATO-Medium ausgesät. Die Zellen wurden nun für 24 Stunden inkubiert bevor wir sie mit 100 mM Sodiumazid für 0 Minuten bzw. 24 Stunden behandelten und unter dem live-cell Mikroskop analysierten. In weiteren Versuchen erfolgte die Behandlung und Analyse unter dem live-cell Mikroskop mit 100 mM Sodiumazid für 0, 60, 90, 120, 150, 180 Minuten bzw. 24 Stunden. Das modifizierte SATO-Medium der (Negativ-) Kontrolle wurde zeitgleich mit Beginn der Sodiumazidbehandlung gewechselt. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurde das Medium vollständig mit modifiziertem SATO-Medium ersetzt und die Zellen für insgesamt 24 Stunden analysiert. Während der Analyse lagen Kulturbedingungen von 37°C und 5% CO₂ vor. Alle fünf Minuten wurde ein digitales Bild erstellt und gespeichert.

In der vorliegenden Arbeit verwende ich folgende Benennung der Behandlungsgruppen: C= Kontrolle (ohne Sodiumazidbehandlung); C-SA= Positivkontrolle (24-stündige Sodiumazidbehandlung); A-60, A-90, A-120, A-150, A-180 (60-, 90-, 120-, 150-, 180-minütige Sodiumazidbehandlung).

3.7. Auswertung

3.7.1. Hirnregion (R265)

Bei den Versuchen untersuchten wir Cuprizone-vulnerable Hirnregionen (vor allem mediales CC – Region 265). Zur Orientierung nutzen wir den Mäusegehirn-Atlas von Sidman und Kollegen [101].

3.7.1.1. IHC

Wir nutzen Schnitte aus der Region 265 [101] und färbten diese immunhistochemisch. Die Analyse erfolgte innerhalb des medialen CC.

3.7.1.2. TEM

Die Orientierung erfolgte mittels Semidünnschnitten und engen ROIs (engl.: *Region of Interest*) vom medialen CC.

3.7.1.3. 3D-EM

Die Schnitte und Bilder des medialen CC wurden durch die Firma *Renovo* hergestellt.

3.7.2. Quantifizierung und Analyse von Immunfluoreszenzschnitten

Innerhalb der Zielregion wurden mehrere (3-5) zufällige Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop angefertigt und diese Bilder anschließend mit Hilfe der Software *ImageJ* analysiert.

Die Quantifizierung erfolgte durch manuelle Auszählung. Ausmessungen wurden manuell mit Hilfe der Software *ImageJ* getätigt.

3.7.3. TEM

Die Quantifizierung von Zielstrukturen im TEM erfolgte manuell mittels der digitalisierten Bilder in der Software *ImageJ*.

3.7.4. Rekonstruktion von Axonen (3D-EM)

Die Morphologie der Axone und der Myelinscheide wurde mit Hilfe der Software *Reconstruct* dreidimensional rekonstruiert. Hierzu umkreiste man morphologisch gleiche und zusammenhängende Strukturen (z.B. Myelinscheide bzw. Axon) auf jeder Schnittebene, sodass ein dreidimensionales Modell entstand.

3.7.5. Quantifizierung von CoMyDs (3D-EM)

Die Quantifizierung erfolgte mittels eines zufällig gesetzten ROIs (Größe: 4757,339 μm^2) im ersten Bild des Bilderblocks eines jeden Tieres. Dieser Areal wurde dann bei Schnitt 100, 300 und 500 (also nach 8, 24 und 40 μm) untersucht und ein CoMyD wurde nur dann gezählt, wenn ein Axon innerhalb dessen

nachzuweisen war. Dieses Axon musste jedoch nicht im identischen Schnitt zu sehen sein sondern nur innerhalb der Myelinabtrennung liegen (unabhängig der Z-Ebene).

3.7.6. Quantifizierung der Axondickenmessung und Symmetrie (3D-EM)

Die Axonauswahl für die Quantifizierung der Axondicken (ohne Myelin) von myelinisierten Kontrollaxonen erfolgte durch das zufällige Setzen von vier ROIs (Größe/ROI: 125,573 μm^2) im mittlersten Bild des Bilderblockes eines jeden Tieres. In diesem ROI wurde jedes myelinisierte Axon ausgezählt und vermessen. Die Messung erfolgte sechsfach im Verlauf eines Axons und wir verwendeten die entsprechenden Mittelwerte. Nachdem wir bereits nach drei Tieren über 400 Axone analysiert hatten (die Ergebnisse waren vergleichbar mit Ergebnissen in der Literatur[102]), verzichteten wir auf eine Quantifizierung in einem weiteren Tier.

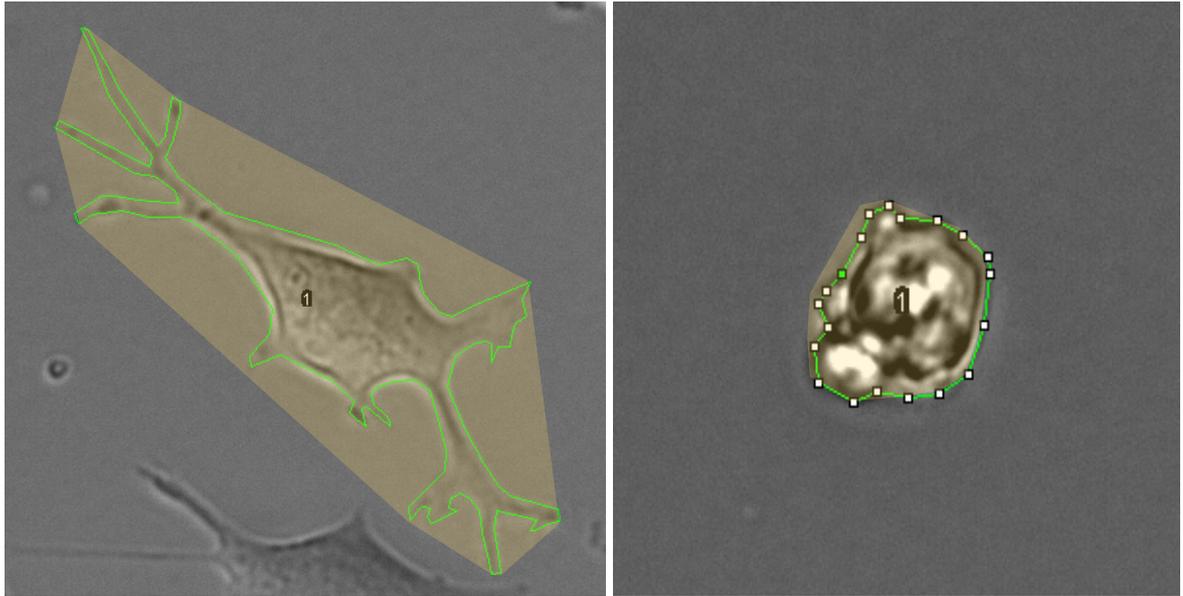
Die Axonauswahl für die Quantifizierung der Axondicken (ohne Myelin) nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung und für die Erhebung der Symmetrie erfolgte durch das zufällige Setzen von 15-25 ROIs (Größe/ROI: 334,782 μm^2) im Bild nach einem Drittel eines jedes Bilderblockes. Im Bereich von ± 50 Bildern (also 4 μm in jede Richtung der Z-Ebene) wurde jedes CoMyD, welches diesen Bereich berührte, analysiert und quantifiziert. Die Axondickenmessung erfolgte sechsfach im Verlauf eines CoMyD-betroffenen Axons (jedoch nicht im Bereich des CoMyDs) und der Mittelwert wurde entsprechend verwendet.

3.7.7. CAP

Für die Analyse wurden pro Schnitt 18-20 Durchläufe für jede Stimulationsstärke gemittelt und die Amplituden von N1 (falls vorhanden) und N2 des ersten Stimulationsimpulses manuell in *Igor Pro* bestimmt.

3.7.8. Ramifizierung ([engl.] *live cell imaging*)

Mittels eines Rasters (Kantenlänge 223,61 μm – 50.000 μm^2) wurden die auszuwertenden Zellen der Lebendzellaufnahmen ausgewählt. Das Auswahlkriterium war, dass ein Teil der Zelle innerhalb der zentralen Fläche des Rasters lag. Bei allen ausgewählten Zellen wurde dann der Ramifizierungsindex berechnet, als Indikator für die Funktionsfähigkeit der Zelle. Dies erfolgte durch Ausmessen der Projektionsfläche der Zellfortsätze und der Gesamtfläche der Zelle (siehe Abbildung 7). Je näher dieser Indexwert bei 1,0 liegt, desto abgerundeter und funktionseingeschränkter ist die Zelle.



Zellfläche: 1009,225 μm^2
Projektionsfläche: 2883,099 μm^2

257,835 μm^2
260,301 μm^2

Ramifizierungsindex (RI)=Projektionsfläche der Fortsätze/Zellfläche

RI = 2,857

RI = 1,010

Abbildung 7: Beispiel der Berechnung des Ramifizierungsindex (Projektionsfläche der Fortsätze geteilt durch die Zellfläche) als Indikator für die Funktionsfähigkeit der Zelle.

3.7.9. Statistische Auswertung

Statische Tests wurden mit Hilfe der Software *GraphPad Prism* erstellt. Unterschiede zwischen Gruppen wurden meist durch ANOVA mit folgendem Tukey's range test untersucht außer beim Vergleich der Axondicken von geschädigten Axonen. Hierbei wurde der Kruskal-Wallis-Test zur Analyse zwischen den Gruppen verwendet. Alle Daten werden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (SEM – [engl.] *standard error of mean*) angegeben. P-Werte $<0,05$ werden als statistisch signifikant angegeben.

4. Ergebnisse

Bis heute ist die genaue Pathogenese der MS unbekannt. Untersuchungen zeigen, dass in präaktiven Läsionen großflächig metabolisch gestresste Oligodendrozyten vorliegen [83, 85]. Wir vermuten, dass der metabolische Stress zu einer distalen Oligodendroglionopathie [70] und in Folge dessen zur Demyelinisierung [86] führen kann. In den folgenden Kapiteln zeige ich unsere Ergebnisse oligodendrozytärer und funktioneller Veränderungen nach metabolischem Stress der Oligodendrozyten.

4.1. Oligodendrozytenstress geht Demyelinisierung in vivo voraus

Zur Untersuchung der morphologischen Veränderungen bei metabolischem Stress der Oligodendrozyten verwendeten wir das sogenannte Cuprizone-Modell. Es ist ein toxisches MS-Mausmodell, bei welchem es durch eine Gabe von Cuprizone zu einer T-Zell-unabhängigen Demyelinisierung kommt. Das anzunehmende Wirkprinzip von Cuprizone ist erklärbar durch dessen Eigenschaft als Kupferchelator, welcher einen wesentlichen Kofaktor der mitochondrialen Atmungskette bindet, diese inhibiert und metabolischen Stress bewirkt [20, 103]. Durch den hohen metabolischen Bedarf der Oligodendrozyten sind diese mutmaßlich besonders vulnerabel [53, 95]. Nachdem in vitro Untersuchungen zeigen, dass durch Blockade der Atmungskette ATF3 überexprimiert wird [83, 87], nutzten wir diesen Stressmarker zur Beschreibung der Stressreaktion auch in vivo [98].

Im Folgenden die Untersuchungsergebnisse, inwieweit der metabolische Stress der Oligodendrozyten einer Demyelinisierung zeitlich vorausgeht.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass es bereits nach 4-tägiger Cuprizone-Behandlung zu einer deutlichen Stressreaktion in reifen APC-positiven Oligodendrozyten kommt. Ca. 65% der APC-positiven Oligodendrozyten [104] exprimierten das Stressprotein ATF3 (Abbildung 8a und b) und ca. 77% aller ATF3-positiven Zellen waren APC-positive Oligodendrozyten, wobei sich die Zahl der APC-positiven Oligodendrozyten in diesem Zeitraum nur geringfügig reduzierte. Nach einwöchiger Cuprizone-Behandlung hatten wir ein vergleichbares Bild mit einer ATF3-Exprimierung in ca. 62% aller APC-positiven Oligodendrozyten (Abbildung 8c). Noch 46% aller ATF3-positiven Zellen waren APC-positiv und es kam zu einer Abnahme der APC-positiven Zellen um ca. 50%.

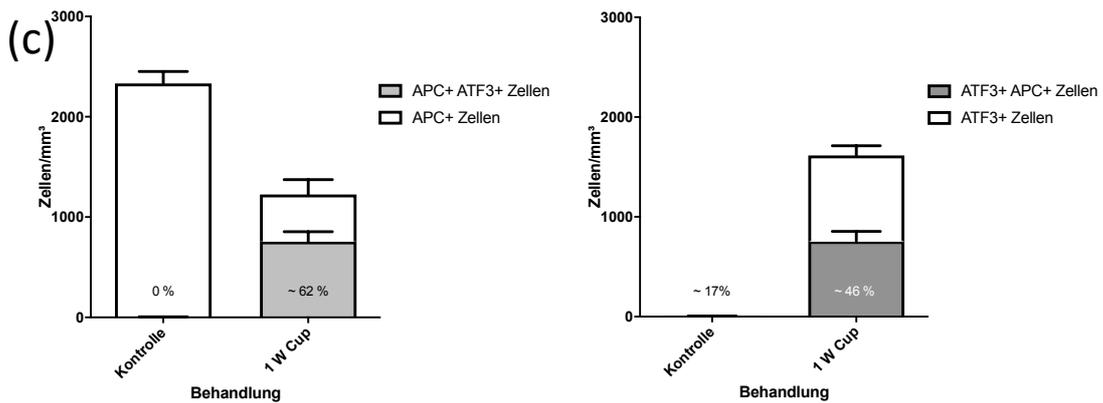
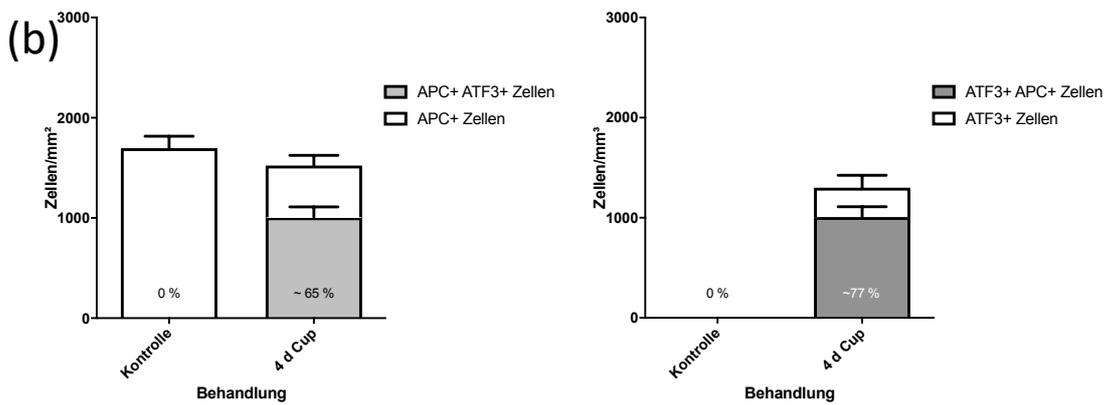
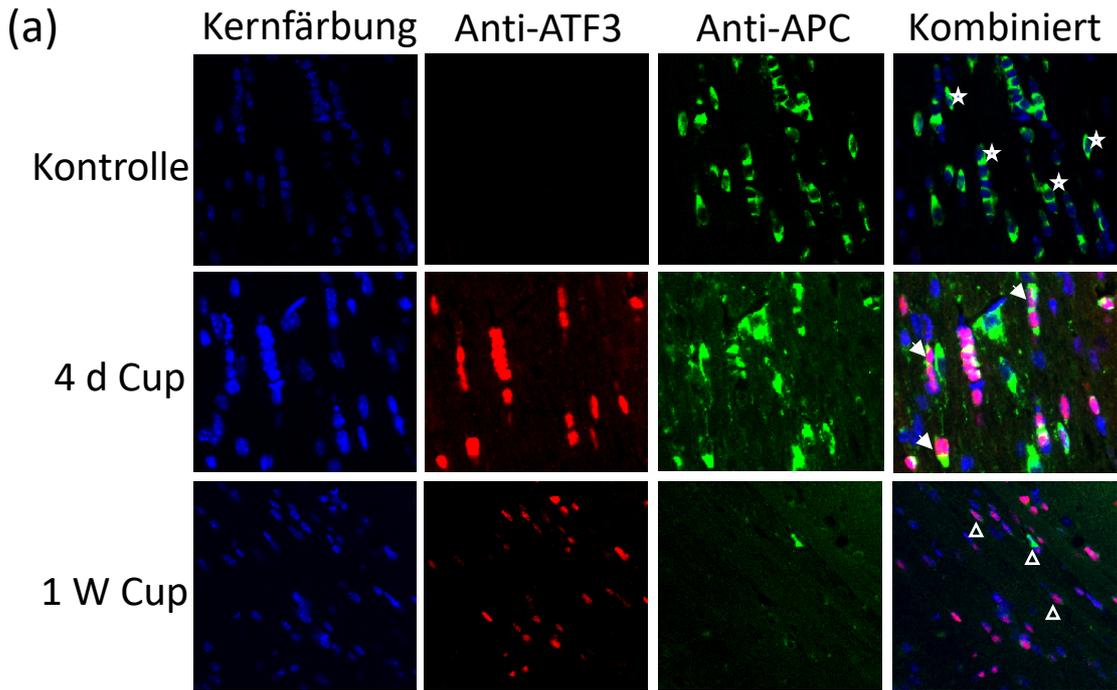


Abbildung 8: Darstellung von metabolisch gestressten Oligodendrozyten im medialen CC bei Kontrolltieren und bei mit Cuprizone behandelten Tieren. (a) Anti-APC-AK wurden zur Darstellung von reifen Oligodendrozyten genutzt [104], Anti-ATF3-AK zur Darstellung von zellulären Stressantwortproteinen als Indikator von metabolischem Stress [87] und Hoechst 33258 als Kernfärbung. Die Sterne zeigen APC-positive Oligodendrozyten. Die Pfeile (nach 4 Tagen Cuprizone) bzw. Pfeilspitzen (nach 1 Woche Cuprizone) zeigen APC-ATF3-doppelpositive Oligodendrozyten. (b) Ergebnisse der Quantifizierung der APC-positiven Zellen, der ATF3-positiven Zellen sowie des Anteils ATF3-positiver Oligodendrozyten (APC-positiv) und des Anteils APC-positiver Zellen von ATF3-positiven Zellen nach 4 Tagen Cuprizone. (c) Ergebnisse der Quantifizierung der APC-positiven Zellen, der ATF3-positiven Zellen sowie des Anteils ATF3-positiver Oligodendrozyten (APC-positiv) und des Anteils APC-positiver Zellen von ATF3-positiven Zellen nach 1 Woche Cuprizone. Abkürzungen: d [Tage]; W [Woche].

Ergebnisse

Nachdem wir nachweisen konnten, dass es durch eine Cuprizone-Intoxikation zu einer initialen Stressreaktion in den Oligodendrozyten kommt, ergab sich die Frage der Klärung der Reihenfolge der Schadensereignisse. Falls nach kurzer Cuprizone-Intoxikation (maximal 1 Woche) eine Stressreaktion, jedoch keine Demyelinisierung festzustellen ist, diese aber im späteren Verlauf auftritt, so könnten wir von einer zentrifugalen Schadensausbreitung (siehe Abbildung 2c) ausgehen. Dies bedeutet, dass ein zentraler oligodendrozytärer Stress bzw. ein Schadensereignis einer distalen Schädigung am Myelin (Demyelinisierung) vorausgeht. Dies steht im Gegensatz zu der Autoimmunhypothese bei der es AK-bedingt distal am Oligodendrozyten (Myelin) zu Schäden kommt und eine zentripetale Ausbreitung mit dem Zelltod folgt [62]. Immunhistochemische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass mit einer dreiwöchigen Cuprizone-Intoxikation die Demyelinisierung beginnt, es bei kürzerer Intoxikation jedoch zu keiner nennenswerten Myelinverminderung kommt [105]. In Ergänzung zur Immunhistochemie untersuchten wir die Myelindichte nach einwöchiger Cuprizone-Gabe auf ultrastruktureller Ebene (Abbildung 9a). Hier zeigte sich kein Unterschied in der Myelindichte zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe (Abbildung 9b).

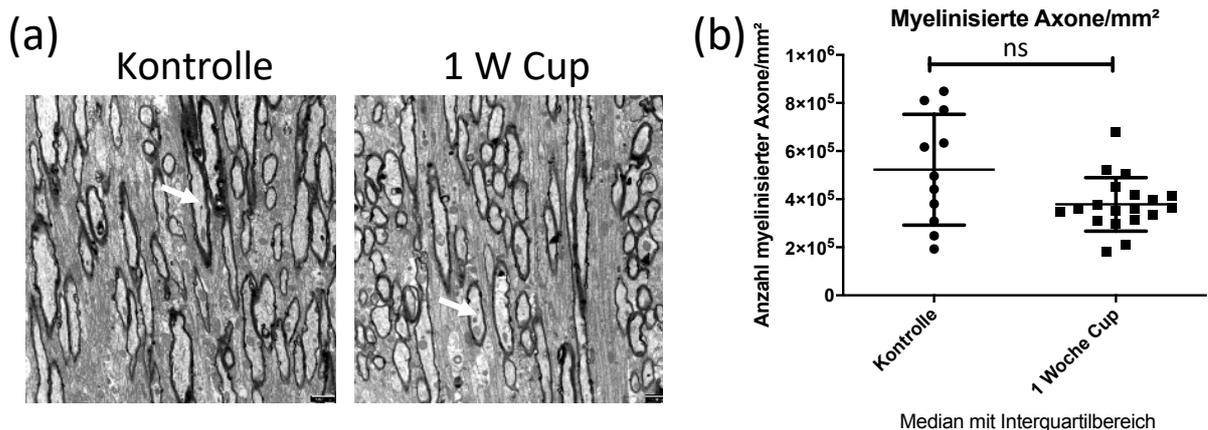


Abbildung 9: Untersuchung der Myelindichte auf ultrastruktureller Ebene. (a) stellt myelinisierte Axone (weiße Pfeile) im CC in Kontrolltieren und nach 1 Woche Cuprizone mittels TEM dar und (b) zeigt Ergebnisse der Quantifizierung myelinisierter Axone. Maßstab: 1000 nm in (a).

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Cuprizone-Intoxikation zu einer initialen Stressreaktion im Oligodendrozyten führt. Eine Abnahme der Myelindichte zeigt sich immunhistochemisch und ultrastrukturell nicht zum Zeitpunkt der initialen Stressreaktion, sondern folgt, entsprechend einer zentrifugalen Ausbreitung der Schädigung, im Verlauf.

4.2. Auftreten kompakter Myelinabtrennungen (CoMyD) nach dreiwöchiger Cuprizone-Gabe: Immunhistochemische und ultrastrukturelle (3D-EM) Charakterisierung

Teile dieses Kapitels wurden bereits in *Frontiers in cellular neuroscience*. 2022;16. doi: 10.3389/fncel.2022.709596 veröffentlicht.

Nachdem wir nachweisen konnten, dass es bei der Cuprizone-Behandlung initial zu einer Stressreaktion kommt, untersuchten wir die Tiere zu Beginn der Demyelinisierung auf mikroskopischer Ebene. Hiermit wollten wir mögliche morphologische Folgen der andauernden Stressreaktion der Oligodendrozyten untersuchen. Immunhistochemisch ist bekannt, dass die Demyelinisierung nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung beginnt [105]. Wir vermuteten, dass mögliche morphologische Folgen bei Beginn der Demyelinisierung maximal ausgeprägt wären.

Hierfür markierten wir Axone mit Anti-Neurofilament-AK und Myelinscheiden mit Anti-PLP-AK. Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung zeigte im konfokalen Mikroskop mit enger Schichtdicke Myelinabtrennungen bzw. charakteristische Lücken zwischen den markierten Axonen und Myelinscheiden (Abbildung 10a). Es war möglich das Axon im Verlauf der Myelinabtrennung zu verfolgen und es ist zu vermuten, dass es sich bei der Abtrennung um distale morphologische Schäden als Folge der andauernden Stressreaktion in Oligodendrozyten handelt. Die Ergebnisse der Quantifizierung der charakteristischen Myelinabtrennungen in Abbildung 10b zeigen ein signifikant gehäuftes Auftreten nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung ($6,4 \times 10^4 \pm 7,5 \times 10^3 / \text{mm}^3$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($2,2 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^3 / \text{mm}^3$).

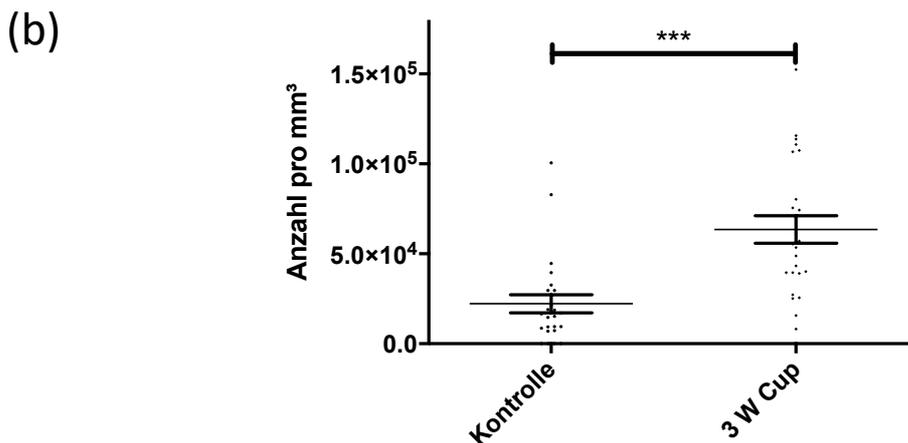
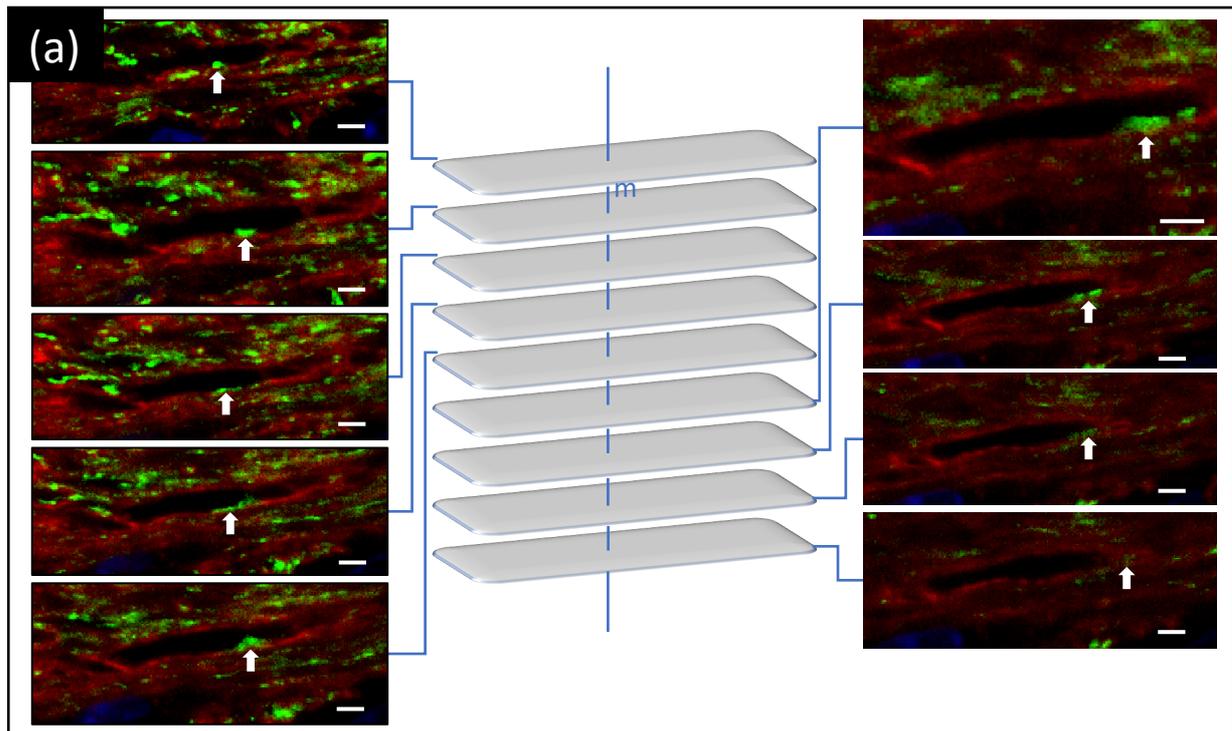


Abbildung 10: Immunhistochemische Untersuchung (a) von Myelinabtrennungen mittels Anti-PLP-AK (grün - Myelinmarker) und Anti-SMI-312-AK (rot - Neurofilamentmarker) in konfokalen Bilderfolgen (Abstand $m=0,1 \mu\text{m}$). Der Pfeil markiert das Axon. (b) zeigt Ergebnisse der Quantifizierung der mittels IHC identifizierten Myelinablösungen bei Kontrollen und nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung. Maßstab: $2,5 \mu\text{m}$ (a).

Zur genaueren Analyse der Myelinabtrennungen nutzten wir die 3D-EM-Technologie. Hierbei erhält man neben einer guten zweidimensionalen ultrastrukturellen Auflösung durch einen geringen Schnittabstand auch eine dreidimensionale Darstellung der Region und der Strukturen. Abbildung 11a zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Ausschnitts des CC (Zielregion bei einer Cuprizone-Intoxikation) in einem Kontrolltier mit myelinisierten und unmyelinisierten Axonen, Gliazellen und Blutgefäßen. Abbildung 11b zeigt ein Übersichtsbild des CC nach dreiwöchiger Cuprizone-Gabe. Auch wenn die Demyelinisierung zu diesem Zeitpunkt erst beginnt [105], sieht man bereits eine veränderte Axon- und Myelinmorphologie. Die mit 60-80% häufigste Axon-/Myelinpathologie zu dieser Zeit (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe) ist in Abbildung 11c vergrößert dargestellt.

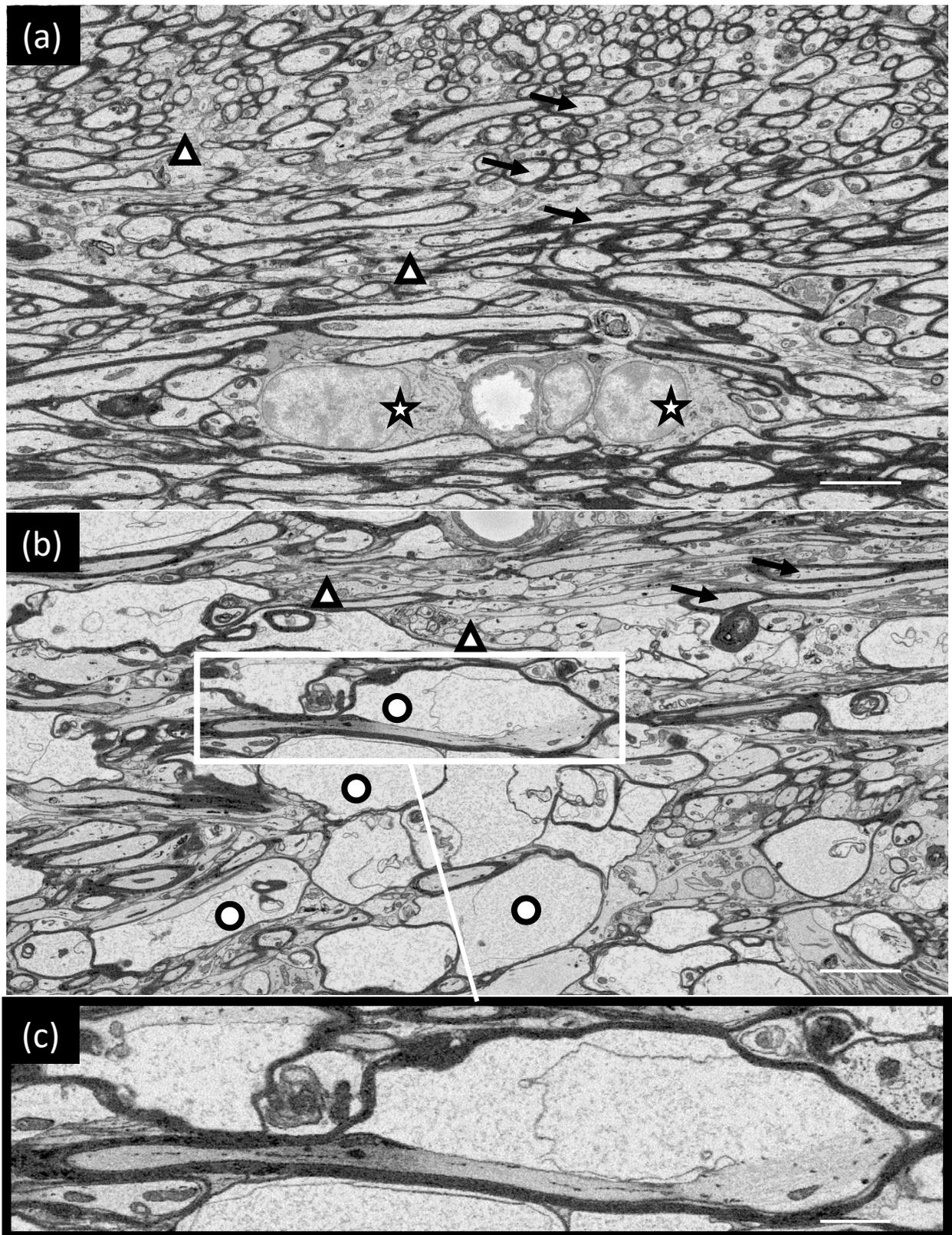


Abbildung 11: Darstellung von Axonen des CC mittels 3D-EM nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation und in Kontrolltieren. Exemplarische myelinisierte (schwarze Pfeile) und unmyelinisierte (Pfeilspitzen) Axone sind markiert. (a) zeigt ein Kontrolltier mit Axonen sowie Gliazellen (Sterne). (b) zeigt das CC nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation. (c) zeigt eine Vergrößerung einer typischen Myelinabtrennung (CoMyD - markiert durch Kreise in (b)) aus dem Bildausschnitt (b). Maßstab: 5 μm (a, b), 2 μm (c).

Man erkennt eine Myelinabtrennung vom Axon, bei welcher es auch zu Ausweitungen und Rupturen des Axolemmes kommt. Wir nennen diese Pathologie „kompakte Myelinabtrennung“ (engl.: *compact myelin detachment* – CoMyD). Weitere Pathologien zu dieser Zeit sind fokale Axonschwellungen (ggf. Vorstufen zu CoMyDs), demyelinisierte Internodien nach einem Ranvier’schen Schnürring [86] und sogenannte Sphäroide (fokale intraaxonale dichte Mitochondrienansammlungen) [52].

Zur Feststellung inwieweit die beschriebenen Myelinabtrennungen in der immunhistochemischen Untersuchung den beschriebenen CoMyDs in der ultrastrukturellen Untersuchung entsprechen, verglichen wir Quotienten der Pathologien. Der Quotient berechnet sich aus der abgelösten Strecke (h) und des Gesamtinnendurchmessers an der weitesten Stelle (i) (h/i in Abbildung 12a). Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 12b dargestellt und man erkennt keinerlei Unterschied der Quotienten. Zusammen mit der morphologischen Erscheinung kann man davon ausgehen, dass es sich um die gleiche Struktur – ein CoMyD – handelt.

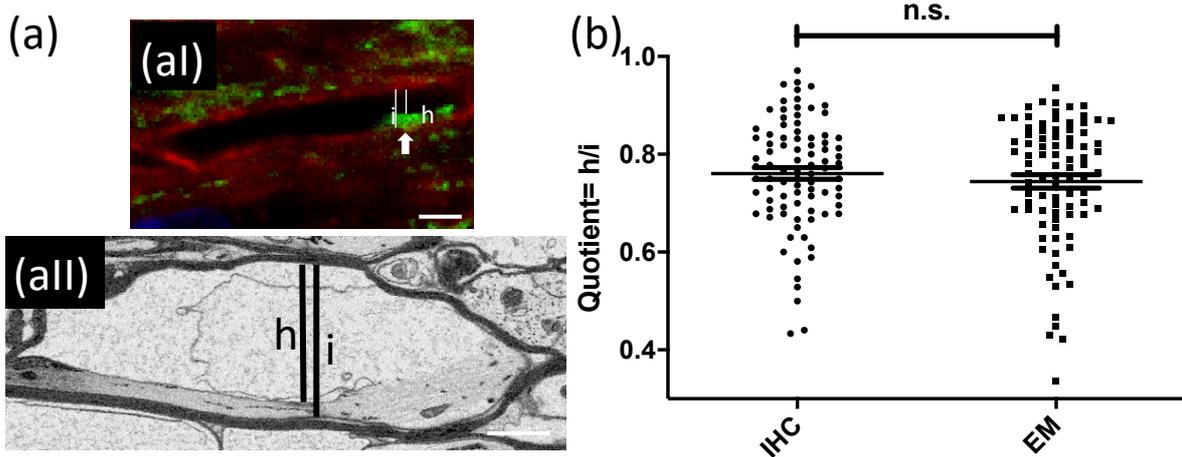


Abbildung 12: Vergleich der gefundenen Pathologien mittels IHC und 3D-EM durch axongrößenunabhängige Quotienten ($=h/i$, siehe beispielhaft in al und all). (b) zeigt Ergebnisse der Quotientenbildung. Maßstab: $2,5 \mu\text{m}$ (al), $2 \mu\text{m}$ (all).

Zur besseren Darstellung und morphologischen Beurteilung der CoMyDs rekonstruierten wir Axone im Verlauf mit Hilfe der Software *Reconstruct*. Abbildung 13 zeigt ein CoMyD im zweidimensionalen Bild (farblich markiert in (a)) und in der dreidimensionalen Rekonstruktion (b). Man erkennt, dass es an einem Ende des CoMyDs zu einer axonalen Verdickung kommt und dass das Axolemm teilweise erweitert und rupturiert ist.

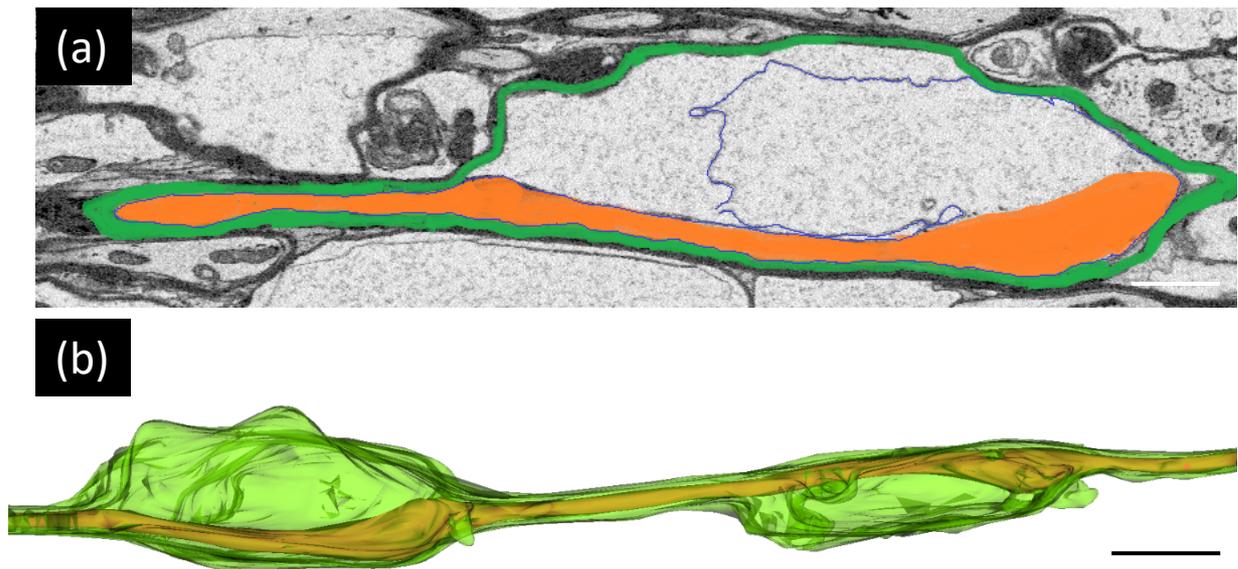


Abbildung 13: Rekonstruktion des in Abbildung 11c vergrößerten Axonabschnitts. (a) zeigt farbliche Markierung einzelner Strukturen in Vorbereitung zur dreidimensionalen Rekonstruktion. Grün markiert das Myelin, orange markiert das Axon und dunkelblau das Axolemm. (b) zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion vom Myelin und dem Axon sowie ein Stück des fortgeführten Axons mit einem weiteren CoMyD. Maßstab: 2 μm (a), 5 μm (b).

Zur Beantwortung der Frage, wie es zu diesen CoMyDs kommt, untersuchten wir einige Charakteristika. Zuerst quantifizierten wir, wie häufig CoMyDs in der dreiwöchigen Cuprizone-Behandlungsgruppe im Vergleich zu Kontrolltieren auftraten. Die Ergebnisse (Abbildung 14a) zeigen in der Cuprizone-Gruppe eine Häufigkeit von $3,1 \times 10^6 \pm 3,4 \times 10^5 / \text{mm}^3$, wohingegen die Häufigkeit der CoMyDs in der Kontrollgruppe bei $4,98 \times 10^4 \pm 3,6 \times 10^4 / \text{mm}^3$ liegt. Es zeigt sich, dass CoMyDs somit hochspezifisch für die dreiwöchige Cuprizone-Intoxikation sind. Dann untersuchten wir, ob gewisse Axongrößen vulnerabler sind als andere. Hierzu ermittelten wir den Axoninnendurchmesser (ohne Myelin) bei zufällig ausgewählten myelinisierten Axonen in Kontrolltieren im Verlauf sechsfach und verwendeten den entsprechenden Mittelwert (Häufigkeitsverteilung in Abbildung 14b gezeigt). Dann ermittelten wir den Axoninnendurchmesser (ohne Myelin in Bereichen ohne CoMyDs) bei zufällig ausgewählten CoMyD-betroffenen Axonen sechsfach im Verlauf des Axons. Auch hier wurde der entsprechende Mittelwert verwendet. Der Vergleich der beiden Häufigkeitsverteilungen zeigt bei CoMyD-betroffenen Axonen eine leichte Verschiebung nach links, somit in den kleineren Durchmesserbereich (Abbildung 14b). Das kann ein Nachweis einer erhöhten Vulnerabilität von kleineren Axonen sein.

Auffallend war, dass es zwei verschiedene Präsentationsformen der Myelinabtrennung gibt (Abbildung 14c). Die Untersuchung erfolgte an 55 zufällig ausgewählten CoMyDs. Bei der häufigsten Form mit ca. 90% kommt es zu einer asymmetrischen Abtrennung der Myelinscheide (Abbildung 14cl). Das Axon steht hierbei noch auf mindestens einer Seite im direkten Kontakt zur Myelinscheide. Die deutlich seltenere Form, die sogenannte symmetrische Form, beinhaltet ein CoMyD, bei welchem die Myelinabtrennung

Ergebnisse

rund um das Axon herum erfolgt (Abbildung 14cII). Das Axon verläuft bei dieser Form abschnittsweise ohne jeglichen Myelinkontakt. Dies wurde in allen drei Raumebenen überprüft.

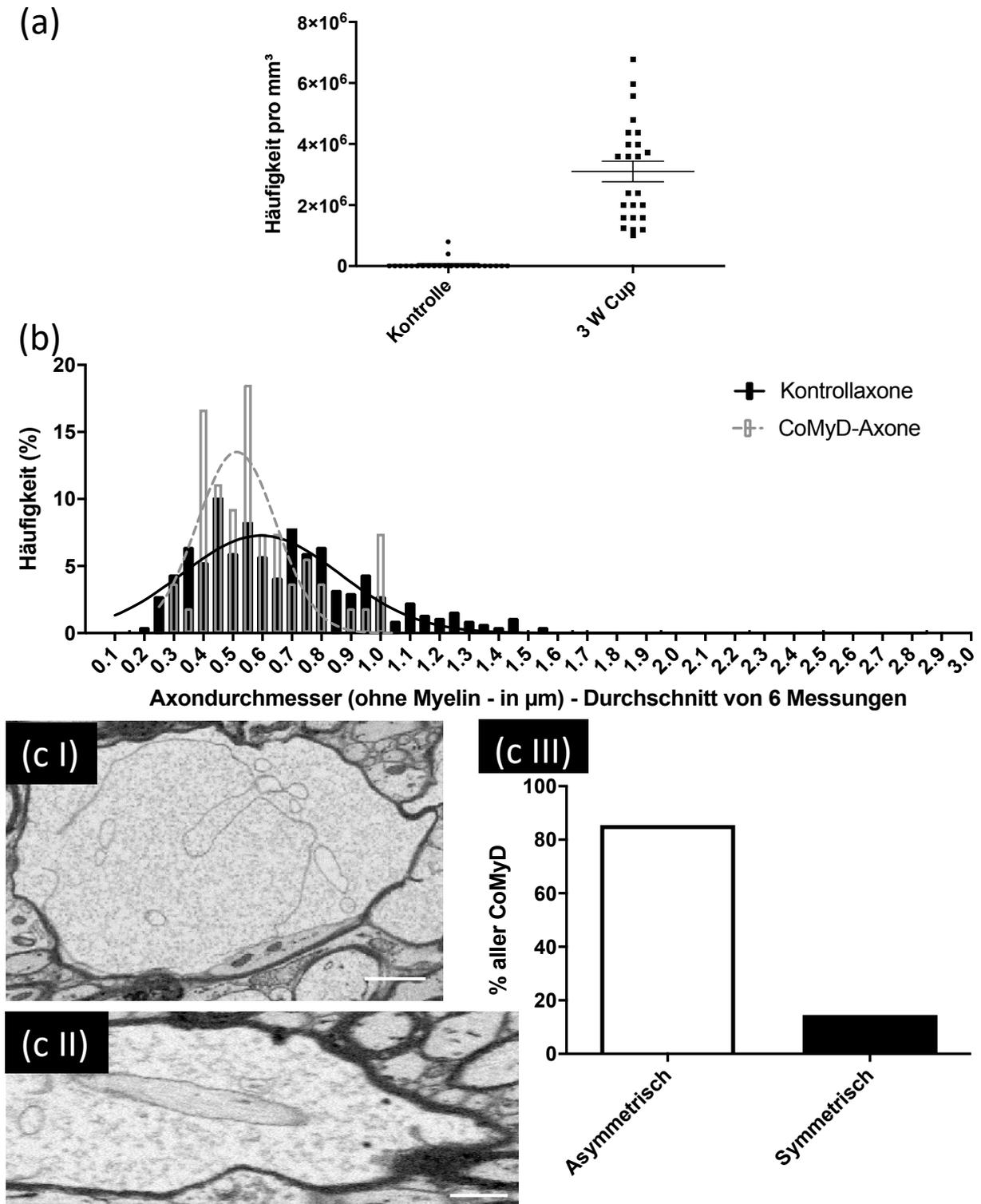


Abbildung 14: Charakteristika der CoMyDs: (a) zeigt Ergebnisse der Quantifizierung der Anzahl der CoMyDs in Kontrollen und nach 3 Wochen Cuprizone. (b) zeigt Axondickenverteilungen (ohne Myelin) bei Kontrolltieren und bei von CoMyD betroffenen Axonen. (c) zeigt räumliche Orientierung des abgehobenen Myelins und entsprechende Quantifizierung (c III). (c I) zeigt ein asymmetrisches CoMyD, dies bedeutet die Abtrennung des Myelins erfolgt einseitig, (c II) zeigt ein symmetrisches CoMyD, hierbei erfolgt die Abtrennung des Myelins rund um das Axon. Maßstab: 2 µm (c I), 1 µm (c II).

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation, bei Beginn der mikroskopischen Demyelinisierung, immunhistochemisch feststellbare Myelinabtrennungen vom Axon zu sehen sind. In weiteren ultrastrukturellen Untersuchungen erkennt man spezielle Myelinpathologien, sogenannte CoMyDs. Sie treten meist mit einseitiger Myelinablösung auf und sind die vorwiegende Pathologie zu diesem Zeitpunkt. Das 3D-EM ist aufgrund der hohen dreidimensionalen Auflösung die Methode der Wahl.

4.3. Abnahme der schnellen Depolarisationsantwort im CC nach dreiwöchiger Cuprizone-Gabe

Teile dieses Kapitels wurden bereits in *Frontiers in cellular neuroscience*. 2022;16. doi: 10.3389/fncel.2022.709596 veröffentlicht.

Nachdem wir die ultrastrukturellen Folgen einer dreiwöchigen Cuprizone-Behandlung untersucht hatten, stellte sich die Frage, welche Auswirkungen die beobachteten CoMyDs auf die Funktionalität, also die Erregungsweiterleitung (CAP), der Axone hat. Da die CoMyDs die überwiegende Pathologie zu diesem Zeitpunkt darstellen, kann man vermuten, dass die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung vor allem durch die CoMyDs bedingt waren. Abbildung 6 zeigt den Versuchsaufbau und Stromkreislauf zur elektrophysiologischen Untersuchung. Ein typisches Reaktionsmuster eines Kontrolltiers ist in Abbildung 15a (rot) dargestellt: Es kommt zu zwei typischen CAP-Antworten N1 und N2. Hierbei ist anzunehmen, dass N1 die schnelle Depolarisierung großer, myelinisierter Axone repräsentiert, wohingegen N2 die langsame Depolarisierung nicht-myelinisierter Axone darstellt [106, 107]. Nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung (Abbildung 15a - grün) sehen die CAP-Antworten verändert aus. Es gibt keine erkennbare N1 – also myelinisierte – Antwort mehr, jedoch eine gesteigerte N2 – also nicht-myelinisierte – Antwort. Mit zunehmender Stimulationsstärke kommt es zu gesteigerten CAP-Antworten (Abbildung 15b). Bei maximaler Stimulation (100 V) kommt es bei den Cuprizone-Tieren zu einer N2-Zunahme von ca. 300%, bei den Kontrolltieren beträgt die Zunahme der N1- und N2-Antworten in Summe ca. 300%.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung die elektrophysiologische Untersuchung eine sogenannte funktionelle Demyelinisierung suggeriert. Es kommt zu einer verstärkten N2-Antwort, wohingegen die N1-Antwort ausbleibt, trotz morphologischem und immunhistochemischem Nachweis von Myelin. Die Erregungsleitung ist vermutlich durch die CoMyDs so reduziert, als handele es sich um de- bzw. nicht-myelinisierte Axone.

Ergebnisse

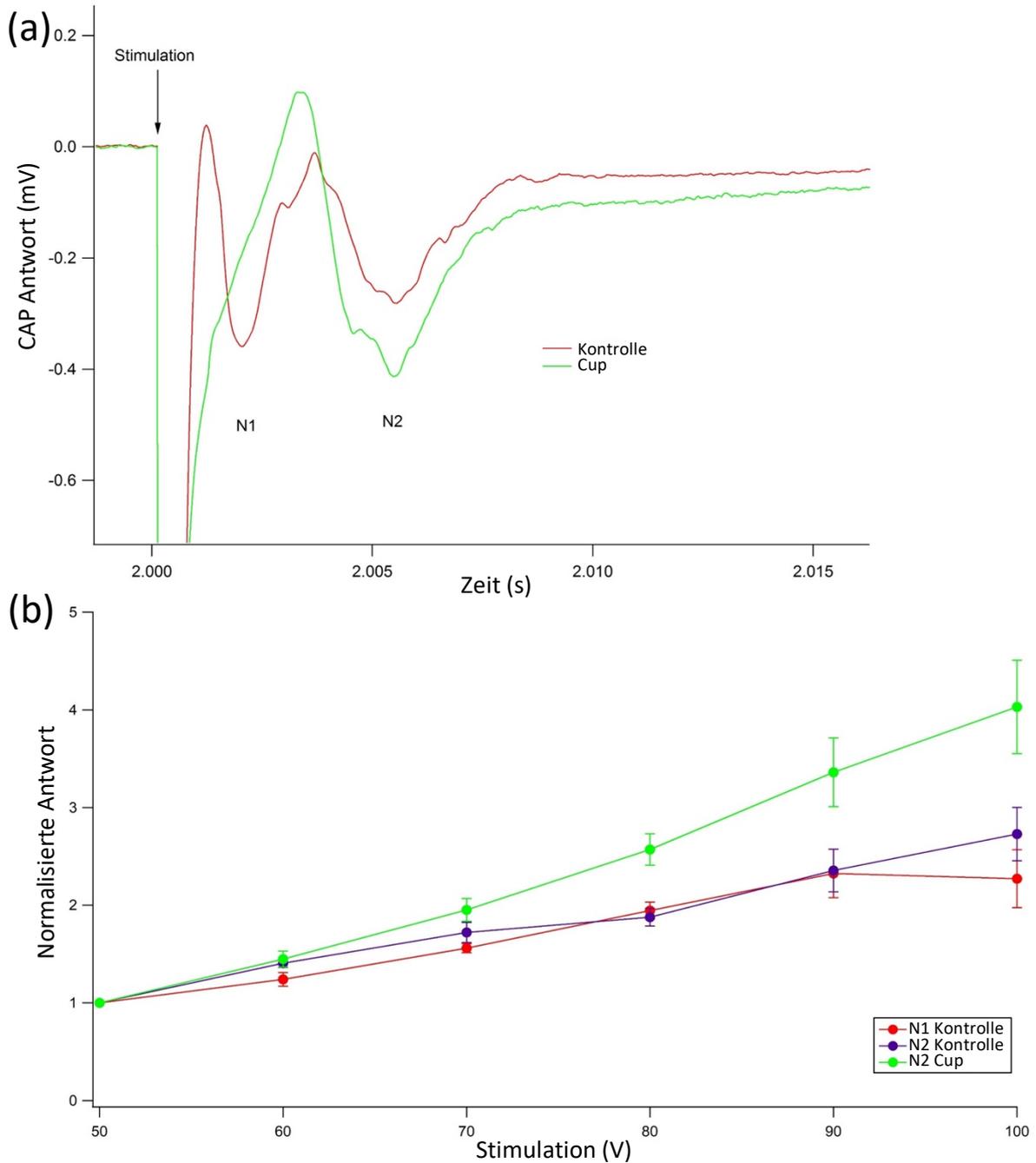


Abbildung 15: Darstellung der Ergebnisse der CAP bei Kontrolltieren und nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung. (a) zeigt die gemittelten CAP-Antworten von Kontrollen und nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung. Es ist anzunehmen, dass N1 die schnellere, durch myelinisierte Axone geleitete Antwort repräsentiert und N2 die langsamere, durch nicht- oder demyelinisierte Axone geleitete Antwort [106]. (b) stellt die normalisierte Antwort in Abhängigkeit der induzierten Stimulationsspannung dar. Abkürzungen: CAP [Compound Action Potential]; Cup [Cuprizone].

4.4. Auftreten von CoMyDs nach einwöchiger Cuprizone-Gabe

Teile dieses Kapitels wurden bereits in *Frontiers in cellular neuroscience*. 2022;16. doi: 10.3389/fncel.2022.709596 veröffentlicht.

Ergebnisse

Wir konnten bereits zeigen, dass die Stressreaktion in Oligodendrozyten unter Cuprizone-Gabe sehr früh einsetzt und nach drei Wochen ausgeprägte Myelinpathologien (CoMyD) zu sehen sind. Es stellte sich dann die Frage, ob nach einwöchiger Cuprizone-Behandlung bereits vergleichbare Myelinpathologien vorhanden sind.

Bereits nach einwöchiger Cuprizone-Behandlung erkennt man ultrastrukturell (jedoch zweidimensional) vereinzelte Ablösungen des Myelins vom Axon (repräsentative Bilder: Abbildung 16a-d). Diese sind nicht so groß, so häufig und eindeutig zu erkennen wie nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung. Die Ergebnisse der Quantifizierung zeigen, dass die Anzahl der identifizierten CoMyDs ($3,1 \times 10^4 \pm 5,2 \times 10^3 / \text{mm}^2$) nach einwöchiger Cuprizone-Gabe ca. 3,5-fach so hoch ist wie in der Kontrollgruppe ($8,8 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3 / \text{mm}^2$) (Abbildung 16e).

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass der Prozess der Myelinabtrennung vom Axon bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Oligodendrozytenstresses auftritt und sich mit der Zeit zunehmend verstärkt.

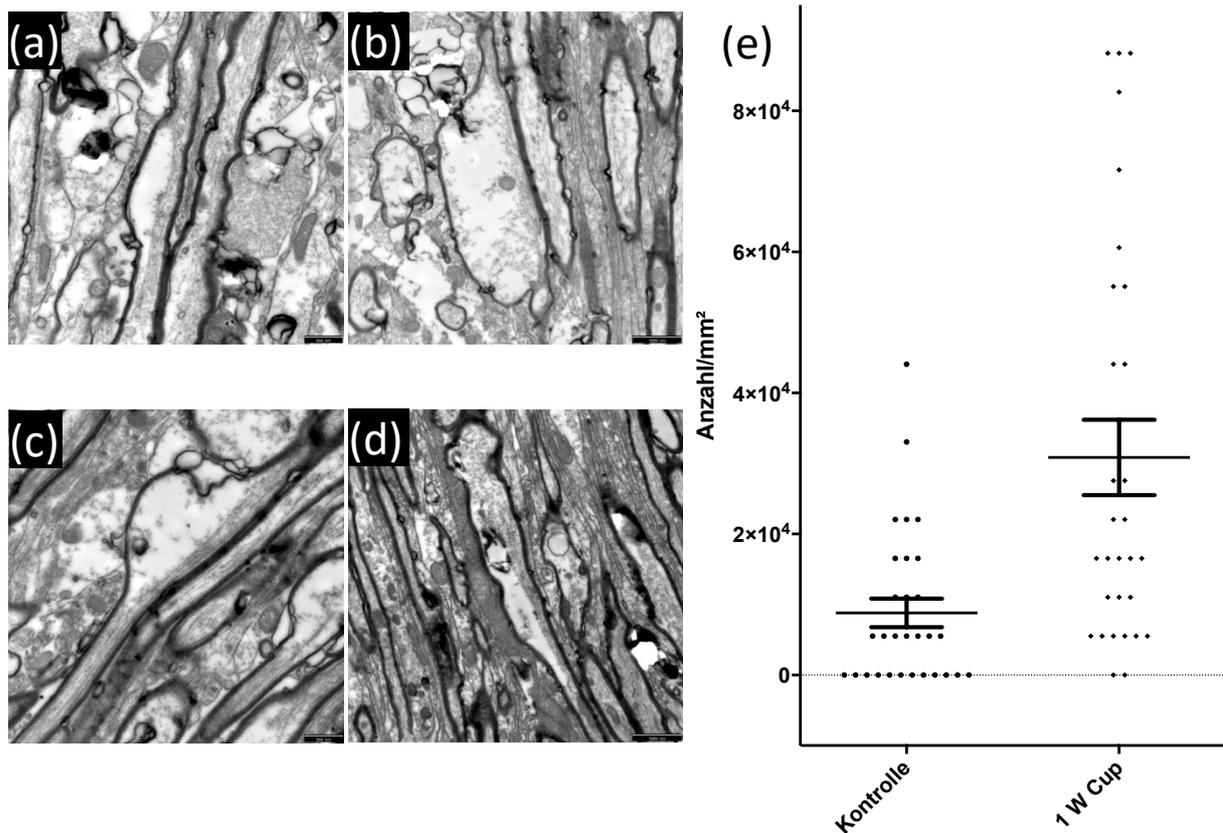


Abbildung 16: Bilder und Ergebnisse der Quantifizierung von CoMyD nach einer Woche Cuprizone. (a-d) zeigen repräsentative Bilder. (e) zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung von CoMyDs. Maßstab: 500 nm (a, c), 1000 nm (b, d).

4.5. Reversible Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze durch Komplex-IV-Inhibitor in vitro

Nachdem wir in vivo festgestellt hatten, dass oligodendrozytärer Stress zu einer Abspaltung der Myelinmembran vom Axon führt, stellte sich die Frage, wie es zu dieser Abspaltung kommt. Wir vermuteten aufgrund der Morphologie der CoMyDs mechanischen Zugkräfte als Folge einer Retraktion der oligodendrozytären Fortsätze. Diese Vermutung untersuchten wir in vitro durch das Induzieren einer mitochondrialen Dysfunktion und somit metabolischem Stress in Oligodendrozyten. Dafür verwendeten wir einen Komplex-IV-Inhibitor (Sodiumazid – SA) der Atmungskette. Hierdurch hatten wir ein vergleichbares Wirkprinzip, wie durch die Cuprizone-Intoxikation in vivo (siehe Kapitel 4.5). Untersuchungen zeigen, dass bei 100 mM SA-Inkubation über 24 Stunden die metabolische Aktivität um mehr als 50% reduziert, die Freisetzung von LDH in das Medium jedoch vergleichbar zu Kontrollen ist [87].

4.5.1. Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze durch Komplex-IV-Inhibitor

In Vorversuchen beobachteten wir nach SA-Gabe eine Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze. Zur genauen Quantifizierung der Retraktion nutzten wir den Ramifizierungsindex (RI - siehe 3.7.8). Dieser setzt die Projektionsfläche der Fortsätze ins Verhältnis zur Zellfläche und zeigt somit zellgrößenunabhängig quantitative Veränderungen der Fortsatzlänge und -verbreitung auf.

In der Kontrollgruppe (C) kam es nach dem Mediumwechsel zu einer RI-Abnahme von 2,4 auf 2,0 (Abbildung 17a). Nach 3-6 Stunden blieb der RI von 2,0 konstant und war nach ca. 12 Stunden wieder auf dem Ausgangsniveau von 2,4. In den folgenden 12 Stunden zeigte sich eine RI-Zunahme auf 2,6. Die Abnahme der Zellprojektionsfläche und somit des RIs in den ersten drei Stunden ist vermutlich durch den zellulären Stress beim Platzieren der Zellen in die Inkubationskammer des Mikroskops und dem Mediumwechsel bei Behandlungsbeginn bedingt.

In der SA-Gruppe beobachteten wir in den ersten 3 Stunden nach dem Mediumwechsel eine RI-Abnahme von 2,5 auf 1,7. In den folgenden 21 Stunden nahm der RI weiter kontinuierlich ab bis auf ein Minimum von 1,2. Dies bedeutet, dass die Zellen kaum noch Fortsätze besaßen. Zu keiner Zeit kam es in der SA-Gruppe zu einer Reversibilität der RI-Abnahme.

Ergebnisse

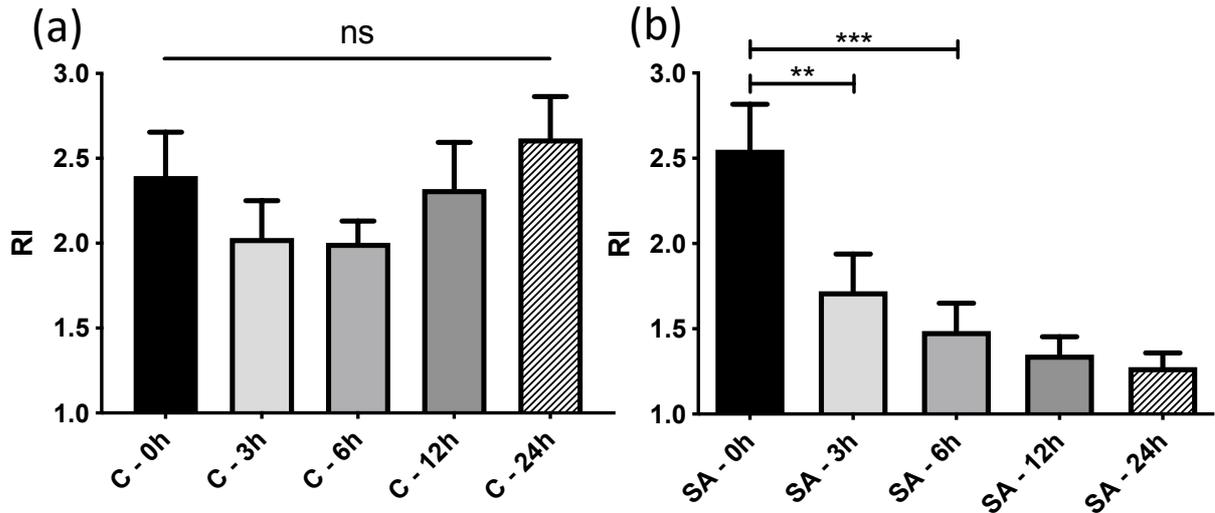


Abbildung 17: Ergebnisse der Quantifizierung des RIs bei Kontrollzellen (a) und unter 100mM SA-Behandlung (b). Abkürzungen: ns [nicht signifikant], h [Stunden].

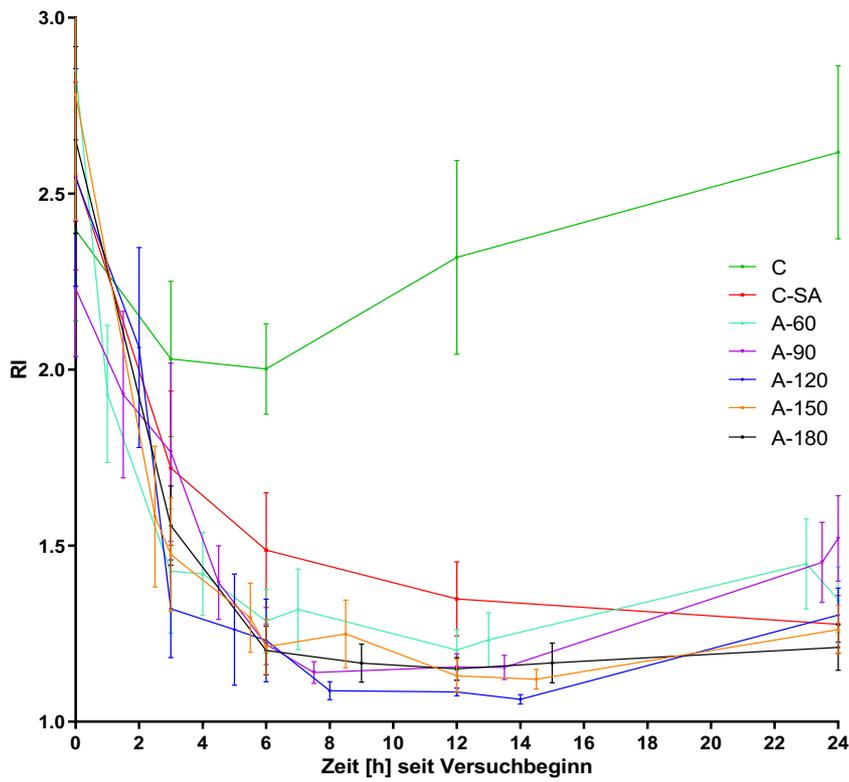
4.5.2. Reversibilität der Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze nach sublethalem Stress in vitro

Aufgrund der vergleichsweise langsamen und kontinuierlichen RI-Abnahme in der SA-Gruppe und Berichten in der Literatur [108, 109] vermuteten wir eine mögliche Reversibilität der Retraktion der Fortsätze nach Entfernen des Toxins. Wir untersuchten deswegen die RIs nach verschiedenen Behandlungsdauern mit SA und anschließend Ersetzen des Mediums mit modifiziertem SATO-Medium.

In allen Versuchsgruppen verringerte sich der RI, vermutlich bedingt durch den Mediumwechsel und den damit verbundenen Zellstress. In den Zellen der Kontrollgruppe C stieg der RI nach ca. 12 Stunden wieder auf Ausgangswerte an (ca. 2,4). In SA-behandelten Zellen (Gruppen C-SA, A-60, A-90, A-120, A-150, A-180) war der RI über den gesamten Behandlungszeitraum geringer als in der Kontrollgruppe C. In allen A-Versuchsgruppen (mit vorübergehender SA-Behandlung) erfolgte bis zu 16 Stunden nach Versuchsbeginn eine größere RI-Abnahme, als bei der Positivkontrolle C-SA mit 24 Stunden SA-Behandlung (Abbildung 18a). Bis zum Zeitpunkt des Mediumwechsels nach Inkubationsende mit SA verlaufen die Kurven der RI-Veränderung der Zellen der A-Versuchsgruppen vergleichbar zu C-SA: z.B. A-180-Gruppe versus C-SA-Gruppe nach drei Stunden. Die danach folgende größere RI-Abnahme der A-Versuchsgruppen im Vergleich zur C-SA-Gruppe ist vermutlich bedingt durch den erneuten Mediumwechsel nach Inkubationsende von SA und den damit verbundenen Zellstress (vgl. Abbildung 17a). Wir beobachteten beginnend ab 12 Stunden nach Versuchsbeginn in allen Behandlungsgruppen (mit Ausnahme der Positivkontrolle C-SA) eine Zunahme des RIs.

Ergebnisse

(a)



(b)

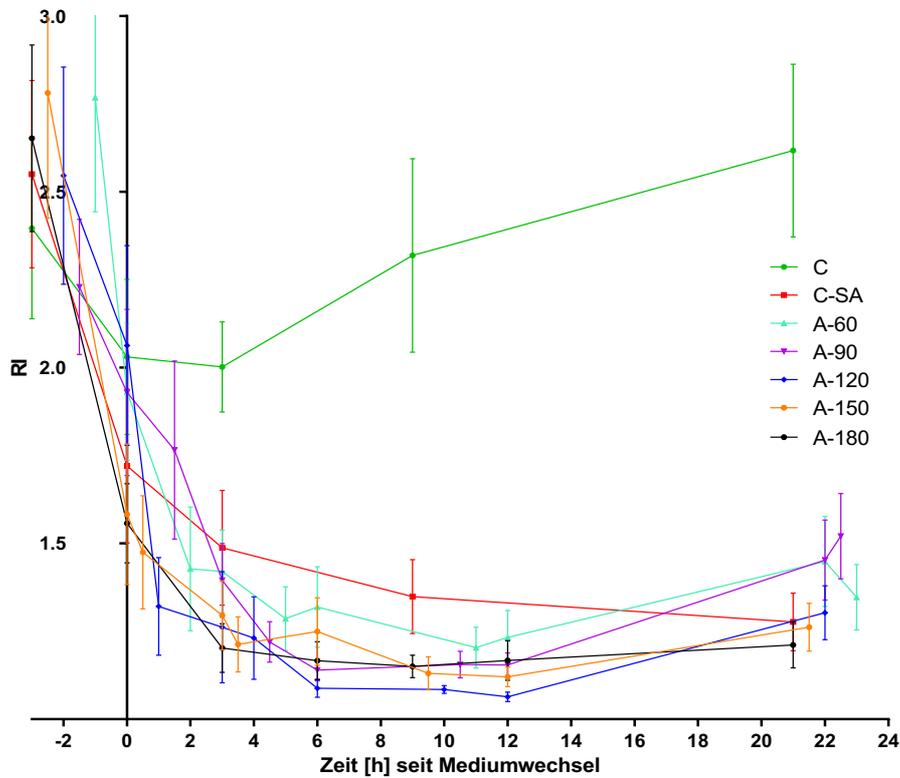


Abbildung 18: Ergebnisse der Quantifizierung des RIs von OliNeu-Zellen während einer 100mM SA-Behandlung in verschiedenen Behandlungsgruppen und Kontrollen. (a) zeigt den Verlauf beginnend bei Behandlungsbeginn (t=0 h), also dem Zeitpunkt der Zugabe von SA. In (b) stellt t=0 h den Zeitpunkt des Mediumwechsels, also der Wegnahme des SA, dar. C und C-SA (Kontrollen) werden zur besseren Verdeutlichung bei x=-3 dargestellt, erhielten jedoch keinen Mediumwechsel.

Ergebnisse

In Abbildung 18b ist dargestellt, wie sich der RI der verschiedenen Versuchsgruppen zu gleichen Messzeitpunkten nach dem erneuten Mediumwechsel mit modifiziertem SATO-Medium unterscheidet. Man sieht, dass sich der RI am Ende der SA-Inkubation (Zeitpunkt $x=0$) abhängig von der Inkubationsdauer mit SA darstellt: Nach 150 bzw. 180 min SA beträgt der RI ca. 1,55, während eine kürzere Inkubationsdauer einen RI von ca. 2 ergibt. In allen Behandlungsgruppen kam es ca. 10-12 Stunden nach dem Mediumwechsel zu einer Zunahme des RIs und damit einer Umkehr der Retraktion der oligodendrozytären Fortsätze. Die C-SA-Gruppe zeigte zu keiner Zeit einen Anstieg des RI.

Durch die sehr deutliche und rasche Abnahme des RIs der A-Gruppen (besonders der RI der A-60-, A-150- und A-180-Gruppe) innerhalb der SA-Inkubationszeit von 2,75 auf 1,95 (A-60), 2,75 auf 1,55 (A-150) bzw. 2,65 auf 1,55 (A-180) vermuteten wir einen Zusammenhang der Größe des initialen RIs (vor Inkubation) und der RI-Abnahme/Stunde während der SA-Inkubation. Die Ergebnisse der Untersuchung in Abbildung 19a zeigen einen deutlichen exponentiellen Zusammenhang zwischen Ausgangs-RI (vor Inkubation) und RI-Abnahme/Stunde während der SA-Inkubation. Der Zusammenhang kann folgendermaßen beschrieben werden: $y=6,662 \cdot 10^{-5} \cdot e^{(3,249 \cdot \text{Ausgangs-RI})}$ mit y =RI-Abnahme/Stunde während der SA-Inkubation und $R^2=0,9680$. Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs normalisierten wir den RI-Verlauf auf den Ursprungs-RI (Abbildung 19b). Man sieht bei allen A-Versuchsgruppen (bedingt bei A-180) im Unterschied zur C-SA-Gruppe eine Zunahme des RIs im Verlauf. In der Gruppe A-90 zeigt sich bereits ab 6 Stunden nach dem Mediumwechsel zu modifiziertem SATO-Medium eine Zunahme des RI. In der A-120-Gruppe erkennt man ab 6 Stunden nach dem Mediumwechsel ein Abflachen der RI-Abnahme und ab 12 Stunden eine RI-Zunahme auf bis zu 50% des Ursprung-RIs. Die größte RI-Abnahme bis zum Mediumwechsel erfolgte mit knapp 40% bei der 150- und 180-minütigen SA-Behandlung. Im Verlauf kommt es bei diesen beiden Behandlungsgruppen nach einer Abnahme auf bis zu 40% des Ursprung-RIs zu einer RI-Zunahme auf ca. 45% des Ursprung-RIs. Die A-60-Behandlungsgruppe weist auch normalisiert auf den Ursprungs-RI mit ca. 30% in einer Stunde den schnellsten RI-Verlust unter allen SA-behandelten Versuchsgruppen auf.

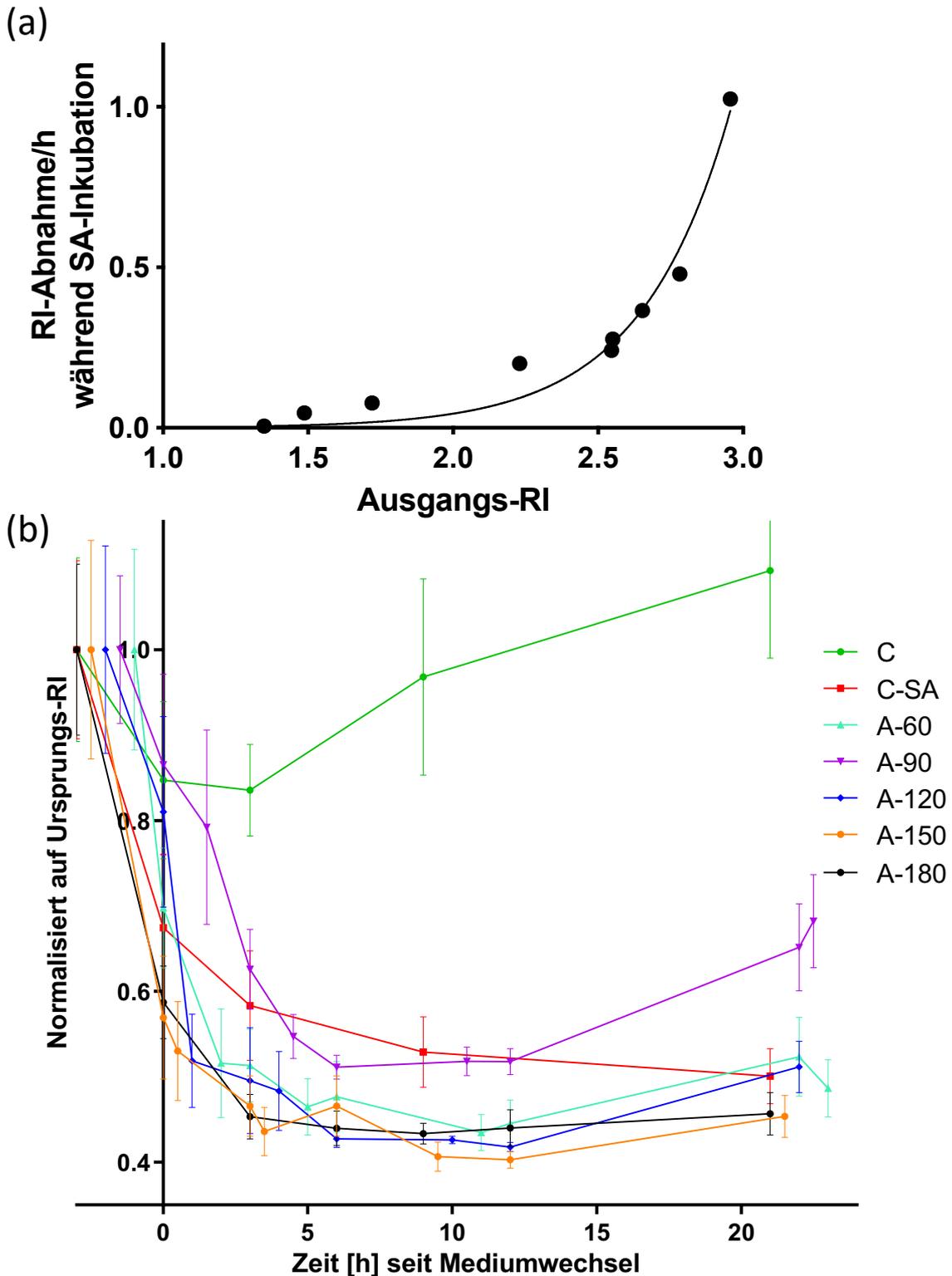


Abbildung 19: Quantifizierung und Analyse vom RI unter SA-Behandlung und Kontrollen. (a) veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Ausgangs-RI und der Geschwindigkeit der RI-Abnahme während der SA-Behandlung. (b) zeigt eine Analyse der RI-Veränderungen der Zellen unter SA-Gabe und nach dem Mediumwechsel ($x=0$) bei Normalisierung auf den Ausgangs-RI. C und C-SA (Kontrollen) werden zur besseren Verdeutlichung bei $x=-3$ dargestellt, erhielten jedoch keinen Mediumwechsel.

Zur Beurteilung der Regenerationsfähigkeit der Zellen nach SA-Schädigung untersuchten wir den RI normalisiert auf den Wert nach dem Mediumwechsel (und somit Ende der SA-Inkubation), um nur den

Ergebnisse

post-Behandlungseffekt vergleichend zu erfassen. In Abbildung 20a erkennt man deutliche Unterschiede bei den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die weitere RI-Abnahme im modifizierten SATO-Medium erfolgte behandlungsdauerabhängig: Nach 60-minütiger SA-Behandlung war die RI-Abnahme geringer als nach 90 Minuten (Minimum der A-60-Gruppe bei ca. 62% des RIs beim Mediumwechsel, Minimum der A-90-Gruppe bei ca. 59%), welche wiederum kleiner war als nach 120 Minuten SA (Minimum der A-120-Gruppe bei ca. 52%). Die Gruppen A-150 und A-180 zeigten nach dem Mediumwechsel die geringste RI-Abnahme (Minimum bei 71% bzw. 74% des RIs beim Mediumwechsel). Hier ist anzunehmen, dass die initiale Schädigung und Abnahme des RIs der Oligodendrozyten nach 2,5 bzw. 3 Stunden (sichtbar in Abbildung 18 und Abbildung 19 – jeweils in b) bereits so ausgeprägt, und deren Vitalität so eingeschränkt war, dass nach Wegnahme des SA keine deutlichen Verschlechterungen mehr möglich waren. Dies ist vergleichbar mit der C-SA-Gruppe: Auch hier war die weitere Abnahme des RIs nach mehr als dreistündiger Behandlung nicht sehr ausgeprägt (Abnahme des RIs bei 6 Stunden auf 86% des RI-Wertes bei 3 Stunden). Im Unterschied zur C-SA-Gruppe hatten die A-150- und A-180-Gruppen einen zusätzlichen zellulären Stress bedingt durch den Mediumwechsel nach Ende der SA-Inkubation. Am Endpunkt der Messungen (nach 21-24 Stunden) sind die normalisierten RIs der A-60- und A-90-Gruppen ungefähr gleich groß (ca. 75% des RIs nach SA-Inkubationsende) und sind deutlich größer als der RI der A-120-Gruppe (ca. 63% des RI nach SA-Inkubationsende), während der RI der C-SA-Gruppe deutlich niedriger ist (49%).

Die gezeigte Geschwindigkeit der RI-Abnahme nach dem Mediumwechsel normalisiert auf den Ursprungs-RI (Abbildung 20b) bestätigt die dosisabhängige Reversibilität der RI-Abnahme der Oligodendrozyten nach erfolgtem Mediumwechsel. Unmittelbar nach dem Mediumwechsel nahm der RI der A-120-Gruppe am schnellsten ab (-0,105), wohingegen die RIs der A-90- und A-60-Gruppe langsamer abnahmen (-0,08 bzw. -0,06). Die Zellen der A-150- sowie der A-180-Gruppe wurden bereits während der Inkubationszeit von SA und dem Mediumwechsel so geschädigt, dass keine deutliche weitere RI-Abnahme zu beobachten ist (-0,04 in den ersten 3 Stunden nach Ende der Inkubation, dann ca. 0). Der RI-Wert/Stunde im Zeitraum 0-3 Stunden normalisiert auf den Ursprungs-RI ist vergleichbar mit dem entsprechenden 3-6 Stunden-Wert der Gruppe C-SA (beide Gruppen, sowohl A-180, als auch C-SA wurden entsprechend drei Stunden mit SA inkubiert). Im Zeitintervall 12-24 Stunden nähern sich die RI-Werte aller Behandlungsgruppen an, es bleibt jedoch, mit Ausnahme der A-60-Behandlungsgruppe, bei einer dosisabhängigen Reihenfolge der RI-Änderungs-Werte.

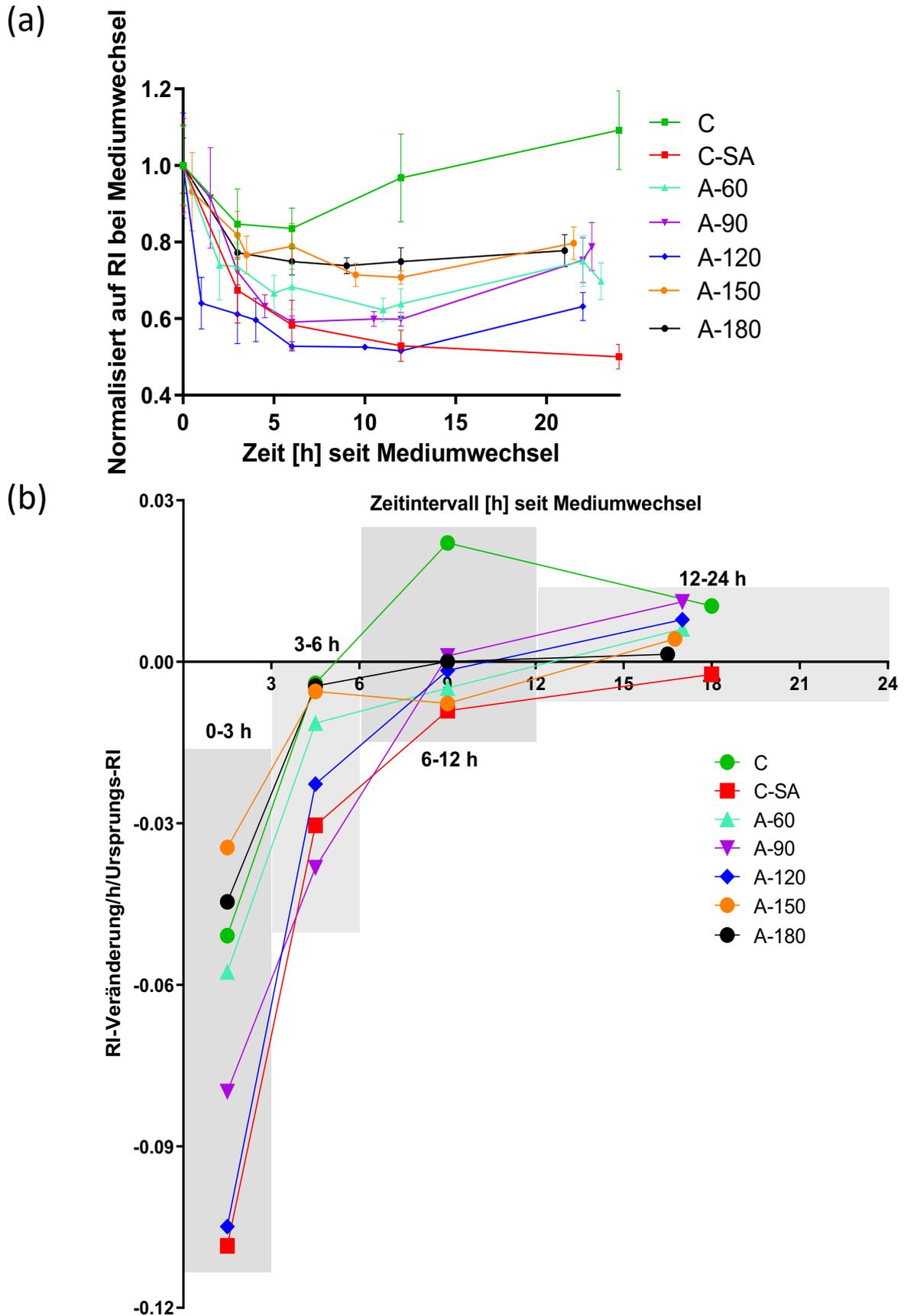


Abbildung 20: Untersuchungen des RI-Verlaufs nach dem Mediumwechsel von SA auf modifiziertes SATO-Medium. (a) zeigt die Regenerationsfähigkeit der Zellen nach dem Mediumwechsel an (RI-Verlauf wurde normalisiert auf den RI-Wert zum Zeitpunkt des Mediumwechsels). (b) zeigt die dosisabhängige RI-Veränderung/Stunde nach dem Mediumwechsel an. Diese ist normalisiert auf den Ursprungs-RI.

Ergebnisse

Zusammenfassend können wir zeigen, dass es durch den metabolischen Stress der Oligodendrozyten zu einer Retraktion der Fortsätze kommt. Die Retraktion erfolgt in Abhängigkeit zur Dauer des metabolischen Stresses sowie in Abhängigkeit der initialen RI-Größe. Dieser Prozess ist reversibel; die Reversibilität ist jedoch ebenfalls dosis- bzw. stressabhängig. Je länger die Zellen dem metabolischen Stress ausgesetzt sind, desto geringer und später erfolgt die Zunahme des RI.

5. Diskussion

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse meiner Arbeit, dass die bei der MS beschriebene primäre, metabolisch-induzierte Oligodendrogliopathie zu inflammationsunabhängigen morphologischen und funktionellen Veränderungen – auch im zeitlichen Verlauf – führt: (1) Dem oligodendrozytären Schaden (i.e. Demyelinisierung) geht metabolischer Stress der Oligodendrozyten voraus. (2) In vivo zeigen sich sogenannte CoMyDs, kompakte Abtrennungen der Myelinscheide vom Axon mit teilweiser Schädigung des Axolemm. Die CoMyDs findet man auf einem Großteil der Axone. Diese Morphologie verstärkt sich mit zunehmender Dauer des metabolischen Stresses. (3) Wahrscheinliche funktionelle Konsequenz der CoMyDs ist eine Aktionspotentialweiterleitung, die vergleichbar mit einem nicht-myelinisierten Axon ist. (4) In vitro kommt es durch metabolischen Stress zu einer dosisabhängigen und somit stressabhängigen Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze. Diese Retraktion – als möglicher Mechanismus der CoMyD-Entstehung – ist in Abhängigkeit der zeitlichen Dauer des metabolischen Stresses reversibel. Hiermit zeigen unsere Ergebnisse frühe Veränderungen einer metabolisch-induzierten Oligodendrogliopathie, die zum besseren Verständnis der frühen Phasen der MS beitragen können. Diese sind möglicherweise vereinbar mit den initialen Vorgängen bei der sogenannten Inside-Out-Hypothese.

Im folgenden Abschnitt möchte ich die Hauptergebnisse kritisch diskutieren und diese in Bezug zu heutigem Wissen setzen.

5.1. Cuprizone Modell: Oligodendrozytärer Stress geht Demyelinisierung in vivo voraus

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist bis zum heutigen Tag nicht klar, was den ursächlichen Auslöser für die Multiple Sklerose darstellt [9]. Die Rolle der Oligodendrozyten wird, als potentieller erster Schritt der MS-Pathogenese [21], zunehmend wichtiger. Es ist bereits bekannt, dass metabolischer Stress der Oligodendrozyten zur Demyelinisierung führen kann [86]. Der genaue Mechanismus der Demyelinisierung ist jedoch noch nicht verstanden.

Aufgrund der Komplexität der MS gibt es nicht das eine, perfekte Tiermodell. Man muss, je nach Fragestellung, abwägen, wie man diese testen möchte. Wir wollten ein Modell nutzen, bei welchem es zu einem initialen metabolischen Stress der Oligodendrozyten kommt und die Folgen dieser Schädigung untersuchen. Wir verwendeten hierzu das Cuprizone-Modell. Der genaue Wirkmechanismus ist bis heute unbekannt. Man nimmt an, dass es durch einen Kupfermangel [110] zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit Störungen im Energiehaushalt der Zelle kommt und erst sekundär zur Demyelinisierung [20, 94].

In unseren Ergebnissen zeigt sich, wie erwartet, eine deutliche Zunahme der Anzahl ATF3-positiver Zellen bereits nach zweitägiger Cuprizone-Gabe, die mit der nach einwöchiger Cuprizone-Gabe vergleichbar ist. Bemerkenswert ist die Abnahme der Anzahl APC-positiver Oligodendrozyten nach einwöchiger Cuprizone-Gabe bei gleichbleibender Anzahl der ATF3-positiven Zellen im Vergleich zur zweitägigen Cuprizone-Gabe. Hierbei stellen sich die Fragen, inwieweit ATF3 auch durch andere Zellen exprimiert wurde und ob die Abnahme APC-positiver Zellen Apoptose-bedingt war oder ob es stressbedingt zu einer verminderten Expression von Anti-APC-Epitopen in den Oligodendrozyten kam. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass es zu einer verminderten Expression von Anti-APC-Epitopen kommt, da die Apoptoserate (anhand morphologischer Kriterien erfasst) deutlich geringer ausfiel, als die beobachtete Reduktion APC-positiver Zellen in Abbildung 8c [86]. Dies passt zu den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die untersuchte, an welches Antigen Anti-APC-AK in Oligodendrozyten binden: Der AK markiert das RNA-bindende Protein QKI7, welches RNA von mehreren Myelinproteinen stabilisiert und v.a. während der Myelinisierung exprimiert wird [111-113]. Es überrascht nicht, dass Oligodendrozyten in Stresssituationen die Myelinproduktion einstellen, QKI7 herunterexprimiert wird und die Anti-APC-AK somit nicht mehr ihr Zielantigen binden können. Passend hierzu zeigt sich bei Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nach wenigen Tagen einer Cuprizone-Intoxikation eine deutliche Abnahme der RNA, die zur Expression verschiedener Myelinproteine führt [98].

Gleichzeitig ist in ultrastrukturellen Analysen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl myelinisierter Axone im CC in Kontrolltieren und nach einwöchiger Cuprizone-Behandlung messbar. Auch wenn ultrastrukturelle Analysen nur bedingt valide Quantifizierungen erlauben, bestätigen unsere Untersuchungen Ergebnisse, dass oligodendrozytärer Stress einer Demyelinisierung vorausgeht [86, 98, 105].

Aus diesen Gründen eignet sich das Cuprizone-Modell gut für die Untersuchung ultrastruktureller Veränderungen bei primärem metabolischem Stress von Oligodendrozyten in vivo und damit der Untersuchung möglicher früher Erkrankungsvorgänge bei der MS.

5.2. CoMyD: Auftreten und mögliche Pathogenese

Es ist bekannt, dass es in läsionsfernen MS-Biopsien mit sehr geringer Inflammation bereits zu Myelinpathologien kommt [68]. Auffallend ist, dass es hierbei zu Veränderungen der distalsten oligodendrozytären Fortsätze – also am Innersten der Myelinscheide – kommt. Auch Lucchinetti und Kollegen fanden in einer weit beachteten Untersuchung distalste Myelinveränderungen in sogenannten Typ 3-Läsionen (vereinbar mit primärer Oligodendrogliopathie) in MS-Biopsien und -Autopsien [19]. Ähnliche Veränderungen wurden bereits im Cuprizone-Modell durch Ludwin und Kollegen beschrieben

[67]. All diese Veränderungen sind vereinbar mit einer sogenannten [engl.] *dying-back oligodendrogliaopathy* [53, 67, 70], also einer distalen Veränderung oligodendrozytärer Fortsätze, z.B. bedingt durch metabolischen Stress.

Nachdem diese Veränderungen lange nicht näher untersucht wurden, untersuchten wir die distalen Veränderungen im Cuprizone-Modell in der zugrundeliegenden Arbeit mittels konfokaler Mikroskopie und 3D-EM. Wir wählten den Untersuchungszeitraum nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation, da dies den ungefähren Beginn der Demyelinisierung darstellt [105]. Unter der Annahme, dass ein primärer Oligodendrozytenschaden der Demyelinisierung vorausgeht, sollte dieser bei Beginn der Demyelinisierung am ausgeprägtesten und damit gut untersuchbar sein.

Wir fanden sehr prominente distale Veränderungen, welche wir dreidimensional rekonstruierten und [engl.] „*Compact Myelin Detachment*“ (CoMyD) nennen. Diese treten vorzugsweise an kleineren Axonen auf und sind spezifisch in der behandelten Gruppe zu finden. Sie weisen meist (bei ca. 90% aller CoMyDs) ein sogenanntes asymmetrisches Abtrennungsmuster auf. Das asymmetrische Abtrennungsmuster beschreibt, dass es zu einer einseitigen Abtrennung der Myelinscheide kommt. Hierbei bildet sich der neue Raum nicht vollständig um das Axon (ungleich dem symmetrischen Abtrennungsmuster). Ein Teil des Axons ist stets noch im Kontakt zur Myelinscheide. Potenzielle Hypothesen hierzu werden weiter unten aufgeführt.

5.2.1. Methodik

Vor Verwendung des 3D-EM untersuchten wir die Zielregionen mittels immunhistochemischer Methoden. Diese sind in Laboren sehr verbreitet und man benötigt zur Untersuchung dreidimensionaler morphologischer Veränderungen die konfokale Mikroskopie. Mit dieser kann man ebenfalls Bilderfolgen mit definiertem Abstand (wir verwendeten einen Abstand von 0,1 μm) erzeugen und eine dreidimensionale Darstellung vom Gewebe bekommen. Mittels einer Doppelfärbung von axonalen Neurofilamenten und Myelin fanden wir morphologisch auffällige Strukturen: Es handelte sich um charakteristische Lücken zwischen den markierten Axonen und zugehörigen Myelinscheiden.

Die Methodik des 3D-EM ermöglichte uns die hochsensitive und spezifische Untersuchung der Zielregion und der zuvor immunhistochemisch dargestellten Strukturen. Eine Schichtdicke von 80 nm ließ uns die CoMyDs genau rekonstruieren und ultrastrukturell untersuchen. Die CoMyDs sind morphologisch vergleichbar mit den immunhistochemischen Abtrennungen des Myelins vom Axon. Zur weiteren Bestätigung verglichen wir die immunhistochemisch erfassten Quotienten (Verhältnis zwischen Axondicke und der Gesamtweite des (erweiterten) Raums zwischen den Myelinscheiden) mit den ultrastrukturell erfassten. Es liegt nahe, dass es sich um identische Strukturen handelt, da die Untersuchung zum gleichen Zeitpunkt des Tierversuchs erfolgte (zu Beginn der mikroskopischen

Demyelinisierung, i.e. drei Wochen Cuprizone), die gleiche Region untersucht wurde (CC) und diese morphologisch und quantifizierten Ähnlichkeiten bestehen. Man könnte argumentieren, dass die immunhistochemisch-erfasste CoMyD-Anzahl im Vergleich zur ultrastrukturell-erfassten Anzahl deutlich zu niedrig ist. Dabei ist zu beachten, dass AK bei immunhistochemischen Färbungen niemals eine 100%ige Detektionsrate ihrer Epitope haben; dies liegt unter anderem an den bereits oben erwähnten [engl.] *cross-links*. Aus diesen Gründen ist es nicht überraschend, dass bei der Quantifizierung der 3D-EM-Aufnahmen höhere Zahlen entstanden. Auch die Unterscheidung der einzelnen Axone ist immunhistochemisch schwieriger, da nur die Ziel-Antigene der AK und gegebenenfalls ein unspezifischer Hintergrund markiert sind. Hierdurch kann es zu optischen Überlagerungen verschiedener Axone kommen, die auch in Kontrolltieren (falsch-)positive Ergebnisse suggerieren.

Nachteile der 3D-EM-Methodik sind die geringe Verfügbarkeit und hohe Herstellungskosten. Zur Unterstützung der morphologischen Unterscheidung verschiedener Strukturen ist die Verwendung von Immunogold sinnvoll. Hierbei kann man mittels Primär-AK gezielte Strukturen vor der Einbettung des Gewebes markieren. Diese Primär-AK können dann durch mit verschiedenen großen Goldpartikeln markierte Sekundär-AK ultrastrukturelle Epitope sichtbar machen. Für ein besseres Verständnis der Pathogenese wäre beispielsweise eine Quantifizierung von Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) in CoMyD-Regionen im Vergleich zu Kontrollregionen möglich gewesen (siehe weiter unten).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Wahl der Methodik stark von der zu untersuchenden Fragestellung abhängig ist. Es gibt Fragestellungen, für welche die niedrigere Auflösung der immunhistochemischen Methode ausreichend ist. Dies hat den Vorteil der preiswerteren und schnelleren Verfügbarkeit sowie der leichteren AK-vermittelten Markierung von Zielstrukturen. Es gibt jedoch Fragestellungen, bei welchen man eine hohe ultrastrukturelle Auflösung benötigt und dies gegebenenfalls durch zielgerichtete mit Gold-markierte AK zusätzlich unterstützt.

5.2.2. Mögliche Pathogenese

Bei der von uns beschriebenen Pathologie (CoMyD) handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um zuvor beschriebene Myelinosomen [62] oder sogenannte [engl.] *Myelin Outfoldings* [114, 115]. Entsprechende Charakteristika und Unterschiede der verschiedenen Strukturen werden in Abbildung 21 dargestellt. Bei den Myelinosomen werden Aufspaltungen der Myelinscheide und keine Veränderungen des Axolemm beobachtet [62]; bei den CoMyDs kommt es hingegen zu Veränderungen des Axolemm aber keinen Aufspaltungen der Myelinscheide. Des Weiteren werden die Myelinosomen in einem autoimmunen Tiermodell beobachtet und treten mutmaßlich AK-vermittelt auf [62], wohingegen es bei unserem verwendeten Cuprizone-Modell AK-unabhängig zu Myelinpathologien kommt. Die [engl.] *Myelin Outfoldings* sind erklärbar durch eine verminderte Anzahl des Zytoskelettproteins Septin (SEPT)

[115] bzw. das Fehlen dessen Adapter-Proteins Anilin (ANLN) [114, 115]. Morphologisch kommt es zu einer Erweiterung des Abstands zwischen der sogenannten adaxonalen Membran des Myelins (also der unmittelbaren nicht-kompakten Verbindung zum Axon) und den kompakten Myelinanteilen [115]. Es kommt demnach zu einer Trennung/Ablösung der zwei innersten Myelinmembranen voneinander. Die nach außen erweiterten kompakten Myelinabschnitte lagern sich fast aneinander an und das Axolemm scheint nicht betroffen zu sein. Die Erweiterung ist dadurch erklärbar, dass das SEPT zwischen der innersten kompakten Myelinmembran und der adaxonalen Membran des Myelins lokalisiert ist [115]. Bei den CoMyDs handelt es sich eher um eine Ablösung/Trennung der innersten Myelinmembran (adaxonal) vom Axolemm und damit einer Erweiterung des periaxonalen Raums.

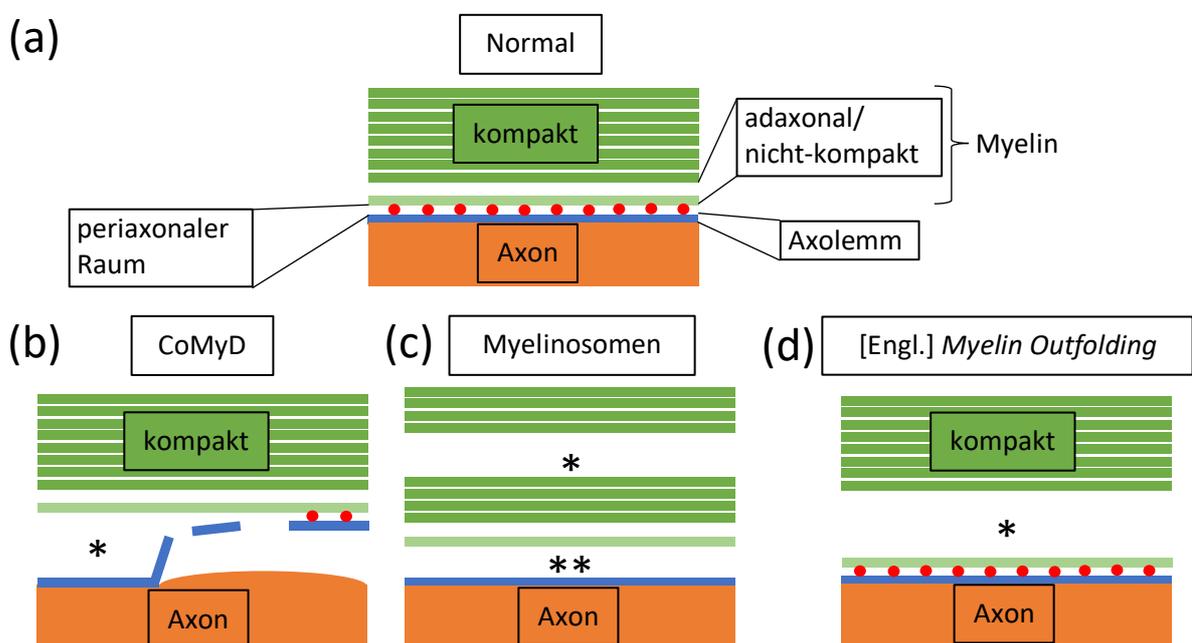


Abbildung 21: Schematische Darstellung verschiedener Myelinabtrennungen vom Axon. (a) zeigt den vereinfacht dargestellten Grundaufbau einer Myelin-Axon-Interaktion: kompaktes Myelin (dunkelgrün), adaxonale bzw. nicht-kompakte Myelinmembran (hellgrün), MAG (rote Punkte), Axolemm (dunkelblau), Axon (orange). (b) zeigt eine typische Erweiterung (*) des periaxonalen Raums mit Ruptur des Axolemm bei CoMyDs. (c) zeigt die für Myelinosomen typische Aufspaltung des kompakten Myelins (*) bzw. die Erweiterung des periaxonalen Raums bei intaktem Axolemm (**). (d) zeigt die Aufspaltung zwischen innerster kompakter Myelinmembran und adaxonaler Membran (*) bei [engl.] Myelin Outfoldings.

Es gibt in der Literatur keine zufriedenstellenden Hinweise, wie der Pathomechanismus der kompakten Myelinabtrennung bei CoMyDs erfolgen könnte. Wir wissen auch nicht aus welchem Material der neu entstandene bzw. vergrößerte Raum besteht. Aufgrund der Morphologie sind zwei Szenarien denkbar:

(1) Es kommt zu einem mangelnden Abtransport von Ionen (v.a. Kalium) und in Folge dessen zu einer Erweiterung des periaxonalen Raums (also zwischen Axolemm und innerster Myelinmembran) durch Wasser [45]. Gründe hierfür könnten fehlerhafte Connexin 32-Kanäle sein, oder gestörte K_{ir} 4.1-Kanäle bzw. gehemmte/veränderte Aquaporin 4-Kanäle an den Fußfortsätzen der Astrozyten an der äußeren Hülle des Myelins [45]. In diesem Szenario würde man jedoch die Erweiterung des periaxonalen Raums

bzw. die Ausbildung der CoMyDs symmetrisch um das Axon erwarten. Außerdem konnten wir in unseren Untersuchungen beobachten, dass auch das Axolemm trotz der (in diesem Fall teils intra- und periaxonalen) Raumbildung teilweise noch an der innersten Myelinmembran befestigt war. Dies wäre nur durch eine intraaxonale Wasseransammlung zu erklären. In diesem Falle würde sich die Frage stellen, weshalb keine gleichmäßige Verteilung über das Axon erfolgte. Dieses Szenario erscheint uns insgesamt als eher unwahrscheinlich.

(2) Es kommt zu einer Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze mit Zugkräften. Die Retraktion wäre eine Erklärung, weswegen CoMyDs vorzugsweise asymmetrisch auftreten, da hierbei die Kräfte des Oligodendrozyten auf einer Seite des Axons wirken. Die nächste Frage ist, wieso initial die axogliale Interaktion betroffen ist und es beispielsweise nicht zu einer Ablösung der äußeren Myelinlamelle oder einer generellen Auflockerung des kompakten Myelins kommt. Hier zeigen Untersuchungen, dass gestresste Oligodendrozyten Myelinproteine (v.a. MAG) vermindert exprimieren [116]. Auch in präaktiven MS-Läsionen kommt es initial zu einem Verlust von MAG [19, 64]. Es zeigte sich, dass MAG fast ausschließlich am internodalen Übergang der innersten Myelinmembran und dem Axolemm zu finden ist [65, 117]. Hier interagiert es mit neuronalen Gangliosiden und wirkt mit weiteren Adhäsionsproteinen zusammen [45]. Es ist neben der axoglialen Adhäsion auch für Signale für das Axon bzw. den Oligodendrozyten verantwortlich und damit mitverantwortlich für Erhaltung und Überleben des Axons [117]. Die Retraktion würde auch erklären, wieso es teils zu einer Ruptur des Axolemm kommt bzw. teilweise zu einem „Haften“ des Axolemm an der innersten Myelinmembran. Auch wenn der axogliale Übergang durch die reduzierte MAG-Exprimierung am anfälligsten ist und damit gewissermaßen die Sollbruchstelle darstellt, so genügen bei der noch schwachen Retraktion die Adhäsionskräfte des MAG bzw. anderer Adhäsionsproteine um den axoglialen Übergang intakt zu halten. Der Zug wirkt somit am ehesten am Axolemm. Wenn die Kräfte zu groß werden bzw. die Adhäsionskräfte zu klein (z.B. durch eine reduzierte Exprimierung), kommt es zur Ruptur des Axolemm bzw. der Ablösung des Axolemm von der innersten Myelinmembran.

Unklar ist bei diesem Szenario, weshalb das CoMyD nicht das komplette Internodium betrifft, sondern nur fokal entsteht. Gleichzeitig tritt es teilweise innerhalb eines Internodiums multifokal auf und die CoMyDs zeigen manchmal in verschiedene Richtungen. Über potenzielle Gründe kann man nur mutmaßen. Denkbar wären lokal verschieden ausgeprägte MAG-Dichten bzw. Zugkraftrichtungen, die durch die kompakte Myelinschicht verändert und teils fokussiert werden.

Die Messung der Axondurchmesser (ohne Myelin) erfolgte mehrfach pro Axon und der Mittelwert wurde entsprechend analysiert. Die bei uns gefundenen Normalwerte entsprechen Vergleichswerten in der Literatur [102]. Es ist auffallend, dass CoMyDs bevorzugt an kleineren Axonen auftreten. Unter der Annahme, dass CoMyD-betroffene Axone auch eher degenerieren, ist dies vereinbar mit Untersuchungen an MS-Patienten, bei welchen der Axonverlust präferentiell bei kleineren

Axondurchmessern auftrat [118]. Aus welchem Grund besonders die kleineren Axondurchmesser vulnerabler sind ist bis heute nicht geklärt. Überlegungen hierzu sind: (1) Ein Oligodendrozyt myelinisiert entweder mehrere kleinkalibrige oder weniger großkalibrige Axone [119]. Somit wären bei einer Schädigung (bei vorausgesetzter gleicher Vulnerabilität von Oligodendrozyten) direkt mehrere kleinere Axone vs. wenige große betroffen. (2) Bei kleineren Axonen besteht eine geringe Oberfläche zum Myelin, weniger MAG wird exprimiert und diese Axone könnten somit früher anfällig für eine stressinduzierte Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze sein. (3) Am unwahrscheinlichsten ist die Überlegung, dass der geringere Axondurchmesser eine Folge der CoMyDs ist.

Ein Verständnis darüber, weswegen kleine Axone besonders vulnerabel sind, ist notwendig, um Therapiemöglichkeiten zur Prävention des Axonverlusts und der damit einhergehenden irreversiblen Behinderung der MS-Patienten zu entwickeln.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei diesen erstmalig beschriebenen CoMyDs noch viele Unklarheiten zum Auftreten, der Pathogenese und den Folgen bestehen. Welche molekularen Veränderungen bewirken die Entstehung der CoMyDs? In welchen Situationen kommt es zur Ausbildung von CoMyDs? Was ist die Folge und Konsequenz der CoMyDs? Treten sie auch in MS-Patienten auf; falls ja, zu welchem Zeitpunkt? Sind sie reversibel?

Die Morphologie ist vereinbar mit der These einer stressbedingten Retraktion der oligodendrozytären Fortsätze. Diesen Mechanismus untersuchten wir *in vitro*.

5.3. Funktionelle Demyelinisierung bei mikroskopischer Intaktheit des Myelins

Nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung sahen wir vielfache Myelinpathologien im Sinne von CoMyDs und wollten die Funktionalität der betroffenen Axone untersuchen. Die hierbei verwendeten CAP erregen nicht nur ein einzelnes, sondern unzählige Axone in der Zielregion, dem CC. Aufgrund der Häufigkeit der CoMyD-Pathologie (60-80% aller Pathologien nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung – gemäß unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe) ist davon auszugehen, dass die CoMyDs zu großen Teilen die entsprechenden elektrophysiologischen Ergebnisse verursacht haben. Die Ergebnisse zeigen, dass nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung eine schnelle (durch myelinisierte Axone vermittelte) Antwort (N1) nicht mehr nachweisbar und die etwas langsamere (durch nicht-myelinisierte Axone vermittelte) Antwort (N2) vergrößert ist. Dies überrascht, da zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch nur ein geringer (nicht signifikanter) Beginn der Demyelinierung mittels densitometrischer Messungen nachweisbar ist [105]. Die ultrastrukturellen multifokalen Abtrennungen der Myelinscheide (CoMyD) müssen demzufolge verantwortlich sein für eine „funktionelle Demyelinisierung“. Dies beschreibt eine

elektrische Weiterleitung der Axone, vergleichbar wie in nicht- bzw. demyelinisierten Axonen bei vorhandener, wenn auch geschädigter, Myelinscheide. Auch andere Arbeitsgruppen beschreiben den Verlust bzw. eine Abnahme von N1 [120-122]. Klinisch kommt es bei Patienten mit fokalen Demyelinierungsherden im ZNS zu verlängerten Leitungszeiten, im Sinne von Latenzverlängerungen der evozierten Potentiale [123]. Dies ist vereinbar mit einer Abnahme von N1 in den CAP. Eine Zunahme von N2 hingegen wurde bisher nicht beobachtet [122]. Hierbei kam es in den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen entweder zu keiner Veränderung [121] oder es wurde zwischen oberem (Zunahme von N2 nach 5-wöchiger Cuprizone-Behandlung) und unterem Faserbündel (Abnahme von N2 nach 5-wöchiger Cuprizone-Behandlung) des CC unterschieden [120].

Die mikroskopische Demyelinisierung nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung ist reversibel [124]. Es stellt sich die Frage, inwieweit auch die funktionelle Schädigung reversibel ist. Hier gibt es unterschiedliche Ergebnisse: Während Pfeiffer und Kollegen auch nach fünfwöchiger Cuprizone-Behandlung eine Reversibilität der CAP nachgewiesen haben (im unteren Faserbündel vollständig, im oberen in der Tendenz) [120] zeigen die Ergebnisse von Crawford und Kollegen eine vollständige Reversibilität nur bis eineinhalbwöchiger Cuprizone-Behandlung [121].

5.4. Dynamik der CoMyDs in Abhängigkeit des oligodendrozytären Stresses?

Die ultrastrukturelle Untersuchungen nach einwöchiger Cuprizone-Behandlung hatten verschiedene Gründe: Wir erwarteten eine Dynamik bezüglich des Auftretens der CoMyDs und nahmen an, diese bereits zu einem früheren Zeitpunkt zu finden, da Oligodendrozyten bereits nach zweitägiger Cuprizone-Behandlung Stressproteine exprimieren [98]. Des Weiteren zeigen CAP nach 1,5-wöchiger Cuprizone-Behandlung ähnliche Veränderungen [121], wenn auch schwächer ausgeprägt, wie nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung bei unveränderten (densitometrischen) Myelindichten im Vergleich zu Kontrollen [105].

Wir fanden nach einwöchiger Cuprizone-Gabe bereits morphologische Veränderungen der Axone, vereinbar mit der Morphologie der CoMyDs. Die Ergebnisse der verblindeten Quantifizierung der CoMyDs zeigen eine Häufung in der 1-Wochen-Cuprizone Gruppe. Die Erhebung erfolgte mittels zweidimensionaler Bilder, welche eine sichere Identifikation von CoMyDs trotz der ultrastrukturellen Auflösung teilweise erschweren. Des Weiteren sind die Veränderungen weniger deutlich ausgebildet als nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung: (1) die Häufigkeit ist reduziert, (2) die Ablösung der Myelinscheide vom Axon ist weniger weit fortgeschritten und (3) das Axolemm ist meist noch intakt und mit der Myelinscheide verbunden.

Diese teils schwierigere Unterscheidung erklärt auch die Anzahl falsch-positiver Werte in den Kontrolltieren. Trotz allem gehen wir davon aus, dass es sich hierbei um valide Quantifizierungen handelt

und die Dynamik der CoMyD-Entwicklung im Verlauf des metabolischen Stresses durch Cuprizone entsprechend aufgezeigt wird. Weitere Untersuchungen sollten den Zeitraum zwischen einer und drei Wochen Cuprizone-Behandlung adressieren, sowie den Zeitraum bis zur vollständigen Demyelinisierung nach 5-6 Wochen, um den genaueren Verlauf der CoMyD-Entwicklung zu beobachten. Auch Daten während der Remyelinisierung könnten Hinweise geben, inwieweit CoMyDs reversibel sind. Der Goldstandard hierbei wäre allerdings ein [engl.] *in vivo imaging* um Veränderungen des individuellen Tieres zu sehen.

5.5. Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze durch metabolischen Stress

Zur Überprüfung der möglichen Pathogenese der CoMyD-Entstehung untersuchten wir metabolischen Stress in Oligodendrozyten *in vitro*. In unseren Untersuchungen zeigt sich eine dosisabhängige Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze bei Inhibition des Komplex IV der Atmungskette mit SA. Ein Vorteil des [engl.] *live-cell imaging*s ist, dass sich der Verlauf einzelner Zellen unter metabolischem Stress gut beobachten und analysieren lässt. Gleichzeitig wurden die Zellen durch das nötige Transportieren zum Mikroskop und dem Mediumwechsel vor Untersuchungsbeginn gestresst. Dies zeigt sich dadurch, dass die Kontrollzellen erst nach ca. 12 Stunden wieder eine vergleichbare Ramifizierung erreichten. Trotzdem können wir zeigen, dass der Grad der Ramifizierung abhängig von der Dauer der SA-Inkubation ist. Dies passt zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze durch metabolischen/oxidativen Stress darlegen [108, 109]. Die Ergebnisse von Untersuchungen in einem autoimmunologischen MS-Mausmodell zeigen ebenfalls eine Verkürzung und Verminderung oligodendrozytärer Fortsätze [62]. Unklar ist hierbei, ob die Verkürzung durch einen direkten externen immunologischen Abbau erfolgt oder durch die gestressten Zellen selbst; eventuell ist es auch durch beide Gründe bedingt.

Die Retraktion der oligodendrozytären Fortsätze ist in meiner Arbeit in Abhängigkeit der Inkubationsdauer von SA reversibel. Dies beobachteten nur zwei weitere Arbeitsgruppen [108, 109]. Unser Ansatz erlaubt mittels [engl.] *live-cell imaging* und Behandlung unter kontinuierlicher Beobachtung der Zellen über 24 Stunden präzisere und konkretere Aussagen über das Verhalten von Oligodendrozyten unter metabolischem Stress und deren Reversibilität. Allerdings muss beachtet werden, dass wir keine Prüfung einer statistischen Signifikanz durchgeführt haben, da die Anzahl der untersuchten Zellen hierfür zu gering war. Dennoch gehen wir von validen Ergebnissen aus, insbesondere, da diese übereinstimmend zu anderen Arbeitsgruppen sind und die Ergebnisse in Abhängigkeit zueinander schlüssige dosisabhängige Werte zeigen (die Ausnahme der A-60-Gruppe diskutiere ich weiter unten).

Zudem muss bei unseren Ergebnissen beachtet werden, dass die C-SA- sowie die C-Versuchsgruppen jeweils keinem weiteren Mediumwechsel, im Sinne von zusätzlichem Stress, ausgesetzt waren. Dies erklärt, wieso sämtliche A-Versuchsgruppen einen geringeren RI aufweisen als die Versuchsgruppe C-SA. Der Kurvenverlauf nach einem weiteren Mediumwechsel der Gruppen C-SA und C wäre jedoch vermutlich ähnlich, wie die gemessenen Werte, nur mit etwas geringerem RI. Der Mediumwechsel in der Kontrollgruppe C, unmittelbar vor Untersuchungsbeginn, bewirkte eine RI-Abnahme von ca. 0,4.

Überraschend ist die überproportional starke Reaktion der A-60-Gruppe im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen. Der Zusammenhang zwischen Ausgangs-RI und Geschwindigkeit der RI-Abnahme während der SA-Behandlung zeigt, dass die Größe der Zelle die Vulnerabilität für metabolischen Stress erhöht. Auch normalisiert auf die ursprüngliche Größe bzw. Größe nach dem Mediumwechsel (zum Normalmedium) ist die Reaktion der A-60-Gruppe überproportional. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die Zelldichte im Aufnahmefenster der Gruppe SA-60 vergleichsweise hoch war, die Zellen sich vermehrt überlagerten und Fehler bei der Abgrenzung zwischen einzelnen Zellen zu initial (zu) großen RI geführt haben. Zudem standen mutmaßlich weniger Nährstoffe pro Zelle zur Verfügung, was zu einer erhöhten Vulnerabilität der Zellen führte.

Aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit der A-150- und A-180-Gruppen stellt sich die Frage, inwieweit die Geschwindigkeit und Dauer der initialen Schädigung relevant für das Überleben bzw. die Regenerationsfähigkeit von Oligodendrozyten ist.

Zur geeigneteren Vergleichbarkeit und einem besseren Verständnis sollte bei folgenden Untersuchungen (1) auch bei den Kontrollgruppen ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt werden, (2) der Beobachtungszeitraum verlängert werden, (3) auf vergleichbare Zelldichten im Aufnahmefenster zur besseren Unterscheidung der Zellfortsätze und ähnlichen Nährstoff/Zell-Quotienten geachtet werden und (4) für statistisch signifikante Ergebnisse die ausgewertete Zellzahl erhöht werden.

Für ein tieferes Verständnis der stressinduzierten Retraktion der Fortsätze werden weitere Untersuchungen von Oligodendrozyten notwendig sein. Diese sollten *in vitro* (auch unter Verwendung von Gewebekulturen [125], gegebenenfalls auch primären humanen Oligodendrozytenkulturen) und auch *in vivo* (z.B. mittels virusmarkierter Oligodendrozyten [126]) durchgeführt werden. Dies würde das Verständnis des Zusammenspiels der verschiedenen Zellgruppen vertiefen, um die stressinduzierten Folgen besser abschätzen zu können und gegebenenfalls entsprechende Therapien zu entwickeln. Es gibt Hinweise, dass die Retraktion durch eine Hyperphosphorylierung von CRMP-2 (collapsin response mediator protein-2) vermittelt sein könnte [108]. CRMP-2 ist ein Protein, welches bei Phosphorylierung zur Depolymerisierung von Mikrotubuli beiträgt [108]. Die Retraktion könnte ebenfalls Motorprotein-

vermittelt ablaufen [127] und damit Zugkräfte entwickeln. Dies wäre vereinbar mit der in vivo gefundenen Morphologie der CoMyDs.

Falls die oligodendrozytäre Retraktion Teil der Pathogenese der MS und anderer zyto- und neurodegenerativen Erkrankungen ist, zeigt die durch uns festgestellte Reversibilität durch Wegnahme des Stressfaktors Möglichkeiten auf entsprechende Erkrankungen mit antioxidativen Medikamenten zu therapieren. Exogene Antioxidantien zeigten bereits in der Vergangenheit klinische Vorteile in MS-Tiermodellen [90, 128, 129].

Falls die Geschwindigkeit und Dauer der initialen Schädigung die Regenerationsfähigkeit der Oligodendrozyten einschränkt, müsste man umso früher therapeutisch ansetzen, um eine ausreichende Reversibilität zu erzeugen. Es bräuchte hierfür (z.B. bei der MS) entsprechende Biomarker, vor allem jedoch auch therapeutische Möglichkeiten, um die oligodendrozytäre Schädigung frühestmöglich zu verhindern bzw. im (noch unbekanntem) Zeitrahmen der Reversibilität zu therapieren.

5.6. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zu den frühen Veränderungen in einem MS-Mausmodell sind vereinbar mit der Inside-Out-Hypothese der MS (siehe Einleitung). Sie zeigen Möglichkeiten auf, wie ein Fortschreiten der Krankheit unabhängig von einer Inflammation (z.B. in sehr frühen Phasen der Erkrankung, in progressiven Phasen bzw. als Teil einer „stillen Progression“ [13]) erfolgen könnte. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, wie die genaue Pathogenese der Progression (PPMS, SPMS, aber auch die stille Progression bei RRMS) aussieht und wie die Erkrankung – auch kausal – verbessert zu therapieren ist.

6. Zusammenfassung

Bis heute ist die genaue Pathogenese der MS unbekannt; eine Krankheit, die der Hauptgrund für irreversible Behinderung im mittleren Alter darstellt. Nachdem man lange von einer primären Autoimmunerkrankung ausgegangen ist, mehrten sich in den letzten Jahren Hinweise und Theorien, dass ein initialer gehirnintrinsischer pathologischer Prozess eine sekundäre Autoimmunerkrankung hervorrufen könnte – die sogenannte „Inside-Out-Hypothese“. Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit oligodendrozytäre Veränderungen nach metabolischem Stress *in vitro* und *in vivo* für ein besseres Verständnis möglicher initialer gehirnintrinsischer pathologischer Prozesse bei der MS.

In vivo nutzen wir das zytodegenerative MS-Mausmodell Cuprizone in C57BL/6 Mäusen und untersuchten die Gehirne immunhistochemisch (Tag 4, 7, 21 der Cuprizone-Intoxikation), mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, Tag 7), elektrophysiologisch (Tag 21) und mit der hochauflösenden seriellen Rasterelektronenmikroskopie (3D-EM, Tag 21). *In vitro* analysierten wir metabolisch gestresste OliNeu-Zellen mittels [engl.] *live-cell imaging* für 24 Stunden. Der metabolische Stress wurde durch eine temporäre Sodiumazid (SA)-Inkubation (Komplex IV-Inhibitor der Atmungskette für 60-, 90-, 120-, 150-, 180 Minuten und 24 Stunden) mit anschließendem Mediumwechsel induziert.

In vivo bestätigen wir im Cuprizone-Modell, dass Oligodendrozyten primär gestresst sind bevor es zur Demyelinisierung kommt. Mittels 3D-EM identifizieren wir zu Beginn der Demyelinisierung (drei Wochen Cuprizone) eine neue Pathologie, sogenannte CoMyD (engl.: *Compact Myelin Detachment*). Hierbei kommt es nur in Cuprizone-Tieren zu multifokalen Abtrennungen der Myelinscheide vom Axon, teilweise mit rupturiertem Axolemm, vereinbar mit Folgen einer mechanischen Retraktion. Elektrophysiologisch werden diese morphologischen, frühen Veränderungen der Myelinscheide von einer Abnahme der schnellen (myelinisierten) Reizantwort und einer Zunahme der langsamen (nicht-myelinisierten) Reizantwort im Corpus callosum begleitet. Bereits nach einwöchiger Cuprizone-Gabe zeigen sich im TEM CoMyDs, wobei die Quantifizierung aufgrund der fehlenden Dreidimensionalität und der geringeren Ausprägung (in Häufigkeit und Größe im Vergleich zu drei Wochen) erschwert ist. *In vitro* zeigt sich durch induzierten metabolischen Stress eine dosisabhängige Retraktion oligodendrozytärer Fortsätze. Nach Wegnahme des SA ist dieser Prozess dosisabhängig reversibel, wobei die Gruppen mit der längsten Behandlungsdauer (150 bzw. 180 min) eine sehr geringe Regenerationsfähigkeit aufweisen.

Diese Arbeit zeigt die ultrastrukturellen und funktionellen Folgen einer inflammationsunabhängigen primären metabolisch-induzierten Oligodendroglieopathie auf. Durch ein besseres Verstehen dieser initialen Pathologie werden mögliche Ansatzpunkte für neue MS-Medikamente aufgezeigt, die im Langzeitverlauf erfolgsversprechender sein können, als die bisherigen. Die genauen Mechanismen der oligodendrozytären Stressreaktion müssen jedoch noch tiefergehend untersucht werden.

III. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Phänotypen bzw. klinische Verlaufsformen der MS (adaptiert von [15, 16]). Die Diagnosen in den blauen Kästen beruhen auf der medizinischen Geschichte und des Zustands des Patienten, wohingegen der Aktivitäts- und Progressionsgrad jährlich evaluiert wird. (a) zeigt die schubförmigen Subtypen CIS und RRMS. (b) zeigt die progredienten Subtypen SPMS (also einer RRMS folgend) und PPMS (also ohne vorhergehenden schubförmigen Verlauf). Der orangene Stern zeigt eine radiologisch gesicherte Aktivität (vergrößerte T2-Läsion oder Gadolinium-positive Läsion) an.....10
- Abbildung 2: Hypothesen zur Pathogenese der MS. (a) zeigt die zwei vorherrschenden Hypothesen der Initiierung der Erkrankung: Die primäre Autoimmunität (Outside-In) versus die sekundäre Autoimmunität durch eine primäre Zytodegeneration (Inside-Out). Adaptiert von Stys und Kollegen [57]. (b) und (c) zeigen schematisch zwei Möglichkeiten der Oligodendrozytenschädigung. (b) stellt eine initiale periphere oberflächliche Schädigung dar (z.B. durch Antikörper) mit der Folge eines zentripetalen Schädigungsmusters des Oligodendrozyten. (c) zeigt eine zentrale Oligodendrozytenschädigung (z.B. durch mitochondrialen Stress) und infolgedessen eine zentrifugale Ausbreitung der Schädigung: Die morphologische Schädigung ist erstmalig am distalsten Ende des Oligodendrozyts erkennbar, der innersten Myelinscheide. Der rote Stern zeigt jeweils den Ort der morphologischen Schädigung an.15
- Abbildung 3: Tierversuchsgruppen und folgende Methoden. Abkürzungen: d [Tage]; Cup [Cuprizone]; n [Anzahl/Gruppe]; IHC [Immunhistochemie]; TEM [Transmissionselektronenmikroskopie]; 3D-EM [dreidimensionale Elektronenmikroskopie].....29
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Antigen-AK-Interaktion und AK-AK-Interaktion33
- Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der Demaskierung von Antigenen34
- Abbildung 6: Schematische Vorgehensweise bei den CAP: Darstellung des groben Schaltkreises und Platzierung der Elektroden im medialen CC.....38
- Abbildung 7: Beispiel der Berechnung des Ramifizierungsindex (Projektionsfläche der Fortsätze geteilt durch die Zellfläche) als Indikator für die Funktionsfähigkeit der Zelle.41
- Abbildung 8: Darstellung von metabolisch gestressten Oligodendrozyten im medialen CC bei Kontrolltieren und bei mit Cuprizone behandelten Tieren. (a) Anti-APC-AK wurden zur Darstellung von reifen Oligodendrozyten genutzt [104], Anti-ATF3-AK zur Darstellung von zellulären Stressantwortproteinen als Indikator von metabolischem Stress [87] und Hoechst 33258 als Kernfärbung. Die Sterne zeigen APC-positive Oligodendrozyten. Die Pfeile (nach 4 Tagen Cuprizone) bzw. Pfeilspitzen (nach 1 Woche Cuprizone) zeigen APC-ATF3-doppelpositive Oligodendrozyten. (b) Ergebnisse der Quantifizierung der APC-positiven Zellen, der ATF3-positiven Zellen sowie des Anteils ATF3-positiver Oligodendrozyten (APC-positiv) und des Anteils APC-positiver Zellen von ATF3-positiven Zellen nach 4 Tagen Cuprizone. (c) Ergebnisse der Quantifizierung der APC-positiven Zellen, der ATF3-positiven Zellen sowie des Anteils ATF3-positiver Oligodendrozyten (APC-positiv) und des Anteils APC-positiver Zellen von ATF3-positiven Zellen nach 1 Woche Cuprizone. Abkürzungen: d [Tage]; W [Woche].43
- Abbildung 9: Untersuchung der Myelindichte auf ultrastruktureller Ebene. (a) stellt myelinisierte Axone (weiße Pfeile) im CC in Kontrolltieren und nach 1 Woche Cuprizone mittels TEM dar und (b) zeigt Ergebnisse der Quantifizierung myelinisierter Axone. Maßstab: 1000 nm in (a).....44

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 10: Immunhistochemische Untersuchung (a) von Myelinabtrennungen mittels Anti-PLP-AK (grün - Myelinmarker) und Anti-SMI-312-AK (rot – Neurofilamentmarker) in konfokalen Bilderfolgen (Abstand $m=0,1 \mu\text{m}$). Der Pfeil markiert das Axon. (b) zeigt Ergebnisse der Quantifizierung der mittels IHC identifizierten Myelinablösungen bei Kontrollen und nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung. Maßstab: $2,5 \mu\text{m}$ (a).46
- Abbildung 11: Darstellung von Axonen des CC mittels 3D-EM nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation und in Kontrolltieren. Exemplarische myelinisierte (schwarze Pfeile) und unmyelinisierte (Pfeilspitzen) Axone sind markiert. (a) zeigt ein Kontrolltier mit Axonen sowie Gliazellen (Sterne). (b) zeigt das CC nach dreiwöchiger Cuprizone-Intoxikation. (c) zeigt eine Vergrößerung einer typischen Myelinabtrennung (CoMyD - markiert durch Kreise in (b)) aus dem Bildausschnitt (b). Maßstab: $5 \mu\text{m}$ (a, b), $2 \mu\text{m}$ (c).47
- Abbildung 12: Vergleich der gefundenen Pathologien mittels IHC und 3D-EM durch axongrößenunabhängige Quotienten ($=h/i$, siehe beispielhaft in aI und aII). (b) zeigt Ergebnisse der Quotientenbildung. Maßstab: $2,5 \mu\text{m}$ (aI), $2 \mu\text{m}$ (aII).48
- Abbildung 13: Rekonstruktion des in Abbildung 11c vergrößerten Axonabschnitts. (a) zeigt farbliche Markierung einzelner Strukturen in Vorbereitung zur dreidimensionalen Rekonstruktion. Grün markiert das Myelin, orange markiert das Axon und dunkelblau das Axolemm. (b) zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion vom Myelin und dem Axon sowie ein Stück des fortgeführten Axons mit einem weiteren CoMyD. Maßstab: $2 \mu\text{m}$ (a), $5 \mu\text{m}$ (b).49
- Abbildung 14: Charakteristika der CoMyDs: (a) zeigt Ergebnisse der Quantifizierung der Anzahl der CoMyDs in Kontrollen und nach 3 Wochen Cuprizone. (b) zeigt Axondickenverteilungen (ohne Myelin) bei Kontrolltieren und bei von CoMyD betroffenen Axonen. (c) zeigt räumliche Orientierung des abgehobenen Myelins und entsprechende Quantifizierung (c III). (c I) zeigt ein asymmetrisches CoMyD, dies bedeutet die Abtrennung des Myelins erfolgt einseitig, (c II) zeigt ein symmetrisches CoMyD, hierbei erfolgt die Abtrennung des Myelins rund um das Axon. Maßstab: $2 \mu\text{m}$ (c I), $1 \mu\text{m}$ (c II).50
- Abbildung 15: Darstellung der Ergebnisse der CAP bei Kontrolltieren und nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung. (a) zeigt die gemittelten CAP-Antworten von Kontrollen und nach dreiwöchiger Cuprizone-Behandlung. Es ist anzunehmen, dass N1 die schnellere, durch myelinisierte Axone geleitete Antwort repräsentiert und N2 die langsamere, durch nicht- oder demyelinisierte Axone geleitete Antwort [106]. (b) stellt die normalisierte Antwort in Abhängigkeit der induzierten Stimulationsspannung dar. Abkürzungen: CAP [Compound Action Potential]; Cup [Cuprizone].52
- Abbildung 16: Bilder und Ergebnisse der Quantifizierung von CoMyD nach einer Woche Cuprizone. (a-d) zeigen repräsentative Bilder. (e) zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung von CoMyDs. Maßstab: 500 nm (a, c), 1000 nm (b, d).53
- Abbildung 17: Ergebnisse der Quantifizierung des RIs bei Kontrollzellen (a) und unter 100mM SA -Behandlung (b). Abkürzungen: ns [nicht signifikant], h [Stunden].55
- Abbildung 18: Ergebnisse der Quantifizierung des RIs von OliNeu-Zellen während einer 100mM SA -Behandlung in verschiedenen Behandlungsgruppen und Kontrollen. (a) zeigt den Verlauf beginnend bei Behandlungsbeginn ($t=0 \text{ h}$), also dem Zeitpunkt der Zugabe von SA. In (b) stellt $t=0 \text{ h}$ den Zeitpunkt des Mediumwechsels, also der Wegnahme des SA, dar. C und C-SA (Kontrollen) werden zur besseren Verdeutlichung bei $x=-3$ dargestellt, erhielten jedoch keinen Mediumwechsel.56

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 19: Quantifizierung und Analyse vom RI unter SA-Behandlung und Kontrollen. (a) veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Ausgangs-RI und der Geschwindigkeit der RI-Abnahme während der SA-Behandlung. (b) zeigt eine Analyse der RI-Veränderungen der Zellen unter SA-Gabe und nach dem Mediumwechsel ($x=0$) bei Normalisierung auf den Ausgangs-RI. C und C-SA (Kontrollen) werden zur besseren Verdeutlichung bei $x=-3$ dargestellt, erhielten jedoch keinen Mediumwechsel.58
- Abbildung 20: Untersuchungen des RI-Verlaufs nach dem Mediumwechsel von SA auf modifiziertes SATO-Medium. (a) zeigt die Regenerationsfähigkeit der Zellen nach dem Mediumwechsel an (RI-Verlauf wurde normalisiert auf den RI-Wert zum Zeitpunkt des Mediumwechsels). (b) zeigt die dosisabhängige RI-Veränderung/Stunde nach dem Mediumwechsel an. Diese ist normalisiert auf den Ursprungs-RI.60
- Abbildung 21: Schematische Darstellung verschiedener Myelinabtrennungen vom Axon. (a) zeigt den vereinfacht dargestellten Grundaufbau einer Myelin-Axon-Interaktion: kompaktes Myelin (dunkelgrün), adaxonale bzw. nicht-kompakte Myelinmembran (hellgrün), MAG (rote Punkte), Axolemm (dunkelblau), Axon (orange). (b) zeigt eine typische Erweiterung (*) des periaxonalen Raums mit Ruptur des Axolemm bei CoMyDs. (c) zeigt die für Myelinosomen typische Aufspaltung des kompakten Myelins (*) bzw. die Erweiterung des periaxonalen Raums bei intaktem Axolemm (**). (d) zeigt die Aufspaltung zwischen innerster kompakter Myelinmembran und adaxonaler Membran (*) bei [engl.] Myelin Outfoldings.66

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erstsymptomatik der MS entsprechend der Lokalisation (adaptiert von [3])	8
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.....	20
Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsgegenstände.....	22
Tabelle 4: Liste der verwendeten Programme	22
Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien	24
Tabelle 6: Liste der verwendeten Seren.....	24
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper mit Konzentrationen und Herkunft.....	28
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper mit Konzentrationen und Herkunft.....	28
Tabelle 9: Dehydrierung und Paraffineinbettung der Gewebeproben für immunhistochemische Färbungen	30
Tabelle 10: Einbettprotokoll für die Elektronenmikroskopie. Abkürzungen: min [Minuten]; h [Stunden].	32
Tabelle 11: Entparaffinierung und Rehydrierung durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe	33
Tabelle 12: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen.....	35

V. Literaturverzeichnis

1. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology*. 2010;9(5):520-32. Epub 2010/04/20. doi: 10.1016/s1474-4422(10)70064-8. PubMed PMID: 20398859.
2. Kipp M, Hochstrasser T, Schmitz C, Beyer C. Female sex steroids and glia cells: Impact on multiple sclerosis lesion formation and fine tuning of the local neurodegenerative cellular network. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2016;67:125-36. Epub 2015/12/25. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.11.016. PubMed PMID: 26698019.
3. Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol*. 2018;31(6):752-9. Epub 2018/10/10. doi: 10.1097/wco.0000000000000622. PubMed PMID: 30300239.
4. Daltrozzo T, Hapfelmeier A, Donnachie E, Schneider A, Hemmer B. A Systematic Assessment of Prevalence, Incidence and Regional Distribution of Multiple Sclerosis in Bavaria From 2006 to 2015. *Frontiers in Neurology*. 2018;9(871). doi: 10.3389/fneur.2018.00871.
5. Koch-Henriksen N, Thygesen LC, Stenager E, Laursen B, Magyari M. Incidence of MS has increased markedly over six decades in Denmark particularly with late onset and in women. *Neurology*. 2018;90(22):e1954-e63. Epub 2018/05/04. doi: 10.1212/wnl.00000000000005612. PubMed PMID: 29720546.
6. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Multiple Sclerosis Journal*. 2017;23(8):1123-36. doi: 10.1177/1352458517694432.
7. Holstiege J SA, Goffrier B, Bätzing J. Epidemiologie der Multiplen Sklerose - Eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. In: (Zi) ZfdkViD, editor. Berlin2017.
8. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2018;391(10130):1622-36. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1).
9. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2008;372(9648):1502-17. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7).
10. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-73. Epub 2017/12/26. doi: 10.1016/s1474-4422(17)30470-2. PubMed PMID: 29275977.
11. Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis. *Annual Review of Medicine*. 2002;53(1):285-302. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.103909.
12. Manouchehrinia A, Beiki O, Hillert J. Clinical course of multiple sclerosis: A nationwide cohort study. *Multiple Sclerosis Journal*. 2016;23(11):1488-95. doi: 10.1177/1352458516681197.
13. Cree BAC, Hollenbach JA, Bove R, Kirkish G, Sacco S, Caverzasi E, et al. Silent progression in disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2019;85(5):653-66. Epub 2019/03/10. doi: 10.1002/ana.25463. PubMed PMID: 30851128; PubMed Central PMCID: PMC6518998.
14. University of California SFM-ET, Cree BAC, Hollenbach JA, Bove R, Kirkish G, Sacco S, et al. Silent progression in disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2019;85(5):653-66. doi: 10.1002/ana.25463.
15. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86. Epub 2014/05/30. doi: 10.1212/wnl.0000000000000560. PubMed PMID: 24871874; PubMed Central PMCID: PMC4117366.
16. Macaron G, Ontaneda D. Diagnosis and Management of Progressive Multiple Sclerosis. *Biomedicines*. 2019;7(3). Epub 2019/08/01. doi: 10.3390/biomedicines7030056. PubMed PMID: 31362384; PubMed Central PMCID: PMC6784028.

Literaturverzeichnis

17. Kipp M, van der Valk P, Amor S. Pathology of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012;11(5):506-17. PubMed PMID: 22583433.
18. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Bruck W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 2017;133(1):13-24. Epub 2016/12/19. doi: 10.1007/s00401-016-1653-y. PubMed PMID: 27988845.
19. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;47(6):707-17. Epub 2000/06/14. PubMed PMID: 10852536.
20. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2017;27(2):123-37. Epub 2016/10/30. doi: 10.1111/bpa.12454. PubMed PMID: 27792289.
21. Stys PK. Multiple sclerosis: autoimmune disease or autoimmune reaction? *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 2010;37 Suppl 2:S16-23. Epub 2011/01/21. PubMed PMID: 21246931.
22. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology*. 2017;13(1):25-36. Epub 2016/12/10. doi: 10.1038/nrneurol.2016.187. PubMed PMID: 27934854.
23. Hawkes CH, Macgregor AJ. Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Multiple Sclerosis Journal*. 2009;15(6):661-7. doi: 10.1177/1352458509104592.
24. Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, et al. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Annals of clinical and translational neurology*. 2019;6(9):1905-22. Epub 2019/08/09. doi: 10.1002/acn3.50862. PubMed PMID: 31392849; PubMed Central PMCID: PMC6764632.
25. Berg-Hansen P, Celius EG. Socio-economic factors and immigrant population studies of multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica*. 2015;132(199):37-41. Epub 2015/06/06. doi: 10.1111/ane.12429. PubMed PMID: 26046557.
26. Kurtzke JF. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*. 2005;16(2):327-49. Epub 2005/05/17. doi: 10.1016/j.pmr.2005.01.013. PubMed PMID: 15893675.
27. Nielsen NM, Munger KL, Koch-Henriksen N, Hougaard DM, Magyari M, Jorgensen KT, et al. Neonatal vitamin D status and risk of multiple sclerosis: A population-based case-control study. *Neurology*. 2017;88(1):44-51. Epub 2016/12/03. doi: 10.1212/wnl.0000000000003454. PubMed PMID: 27903815; PubMed Central PMCID: PMC5200855.
28. Munger KL, Aivo J, Hongell K, Soilu-Hanninen M, Surcel HM, Ascherio A. Vitamin D Status During Pregnancy and Risk of Multiple Sclerosis in Offspring of Women in the Finnish Maternity Cohort. *JAMA neurology*. 2016;73(5):515-9. Epub 2016/03/10. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.4800. PubMed PMID: 26953778; PubMed Central PMCID: PMC4861670.
29. Pantavou KG, Bagos PG. Season of birth and multiple sclerosis: a systematic review and multivariate meta-analysis. *Journal of neurology*. 2019. Epub 2019/05/06. doi: 10.1007/s00415-019-09346-5. PubMed PMID: 31055633.
30. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *Jama*. 2005;293(20):2496-500. Epub 2005/05/26. doi: 10.1001/jama.293.20.2496. PubMed PMID: 15914750.
31. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*. 2015;14(3):263-73. Epub 2015/02/11. doi: 10.1016/s1474-4422(14)70267-4. PubMed PMID: 25662901.

Literaturverzeichnis

32. Kalincik T, Horakova D, Spelman T, Jokubaitis V, Trojano M, Lugaresi A, et al. Switch to natalizumab versus fingolimod in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2015;77(3):425-35. Epub 2014/12/30. doi: 10.1002/ana.24339. PubMed PMID: 25546031.
33. Kremenchutzky M, Rice GP, Baskerville J, Wingerchuk DM, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain*. 2006;129(Pt 3):584-94. Epub 2006/01/13. doi: 10.1093/brain/awh721. PubMed PMID: 16401620.
34. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: implications for counselling and therapy. *Curr Opin Neurol*. 2002;15(3):257-66. Epub 2002/06/05. doi: 10.1097/00019052-200206000-00006. PubMed PMID: 12045722.
35. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature reviews Neurology*. 2012;8(11):647-56. Epub 2012/09/26. doi: 10.1038/nrneurol.2012.168. PubMed PMID: 23007702.
36. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(20):1430-8. doi: 10.1056/NEJM200011163432001. PubMed PMID: 11078767.
37. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*. 2010;133(Pt 7):1914-29. Epub 2010/06/11. doi: 10.1093/brain/awq118. PubMed PMID: 20534650; PubMed Central PMCID: PMC2892939.
38. University of California SFM-ET, Cree BAC, Gourraud P-A, Oksenberg JR, Bevan C, Crabtree-Hartman E, et al. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Annals of Neurology*. 2016;80(4):499-510. doi: 10.1002/ana.24747.
39. Jokubaitis VG, Spelman T, Kalincik T, Lorscheider J, Havrdova E, Horakova D, et al. Predictors of long-term disability accrual in relapse-onset multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2016;80(1):89-100. doi: 10.1002/ana.24682.
40. Tremlett H, Yousefi M, Devonshire V, Rieckmann P, Zhao Y. Impact of multiple sclerosis relapses on progression diminishes with time. *Neurology*. 2009;73(20):1616-23. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c1e44f.
41. Goodin DS, Reder AT, Bermel RA, Cutter GR, Fox RJ, John GR, et al. Relapses in multiple sclerosis: Relationship to disability. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;6:10-20. Epub 2016/04/12. doi: 10.1016/j.msard.2015.09.002. PubMed PMID: 27063617.
42. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52. Epub 1983/11/01. doi: 10.1212/wnl.33.11.1444. PubMed PMID: 6685237.
43. Deller TW, Ulrich; Kummer, Wolfgang. *Lehrbuch Histologie*. 5th ed. München: Urban&Fisher, Elsevier; 2018 20.08.2018.
44. Ritchie JM. On the relation between fibre diameter and conduction velocity in myelinated nerve fibres. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1982;217(1206):29-35. Epub 1982/12/22. doi: 10.1098/rspb.1982.0092. PubMed PMID: 6131421.
45. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiological reviews*. 2019;99(3):1381-431. Epub 2019/05/09. doi: 10.1152/physrev.00031.2018. PubMed PMID: 31066630.
46. Butt AM, Papanikolaou M, Rivera A. Physiology of Oligodendroglia. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1175:117-28. Epub 2019/10/05. doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_5. PubMed PMID: 31583586.
47. Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*. 2012;485(7399):517-21. Epub 2012/05/25. doi: 10.1038/nature11007. PubMed PMID: 22622581; PubMed Central PMCID: PMC3613737.

Literaturverzeichnis

48. Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, et al. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron*. 2016;91(1):119-32. doi: 10.1016/j.neuron.2016.05.016. PubMed PMID: 27292539.
49. Hirrlinger J, Nave KA. Adapting brain metabolism to myelination and long-range signal transduction. *Glia*. 2014;62(11):1749-61. doi: 10.1002/glia.22737. PubMed PMID: 25130164.
50. Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, et al. Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *The Journal of cell biology*. 2004;166(1):121-31. Epub 2004/07/01. doi: 10.1083/jcb.200312012. PubMed PMID: 15226307; PubMed Central PMCID: PMCPMC2172145.
51. Hoflich KM, Beyer C, Clarner T, Schmitz C, Nyamoya S, Kipp M, et al. Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain research*. 2016;1650:125-33. Epub 2016/09/07. doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.048. PubMed PMID: 27592741.
52. Ruhling S, Kramer F, Schmutz S, Amor S, Jiangshan Z, Schmitz C, et al. Visualization of the Breakdown of the Axonal Transport Machinery: a Comparative Ultrastructural and Immunohistochemical Approach. *Molecular neurobiology*. 2019;56(6):3984-98. Epub 2018/09/22. doi: 10.1007/s12035-018-1353-9. PubMed PMID: 30238390.
53. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):37-53. Epub 2009/10/23. doi: 10.1007/s00401-009-0601-5. PubMed PMID: 19847447; PubMed Central PMCID: PMCPMC2799635.
54. McTigue DM, Tripathi RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of neurochemistry*. 2008;107(1):1-19. Epub 2008/07/23. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05570.x. PubMed PMID: 18643793.
55. Thorburne SK, Juurlink BH. Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *Journal of neurochemistry*. 1996;67(3):1014-22. Epub 1996/09/01. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67031014.x. PubMed PMID: 8752107.
56. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2015;14(4):406-19. Epub 2015/03/21. doi: 10.1016/s1474-4422(14)70305-9. PubMed PMID: 25792099.
57. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJ. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(7):507-14. doi: 10.1038/nrn3275. PubMed PMID: 22714021.
58. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(7):971-9. Epub 2004/04/07. doi: 10.1084/jem.20031579. PubMed PMID: 15067033; PubMed Central PMCID: PMCPMC2211881.
59. Cheng W, Ma Y, Gong F, Hu C, Qian L, Huang Q, et al. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2012;17:1648-58. Epub 2011/12/29. doi: 10.2741/4010. PubMed PMID: 22201827.
60. Lomakin Y, Arapidi GP, Chernov A, Ziganshin R, Tcyganov E, Lyadova I, et al. Exposure to the Epstein-Barr Viral Antigen Latent Membrane Protein 1 Induces Myelin-Reactive Antibodies In Vivo. *Frontiers in immunology*. 2017;8:777. Epub 2017/07/22. doi: 10.3389/fimmu.2017.00777. PubMed PMID: 28729867; PubMed Central PMCID: PMCPMC5498468.
61. Yadav SK, Mindur JE, Ito K, Dhib-Jalbut S. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2015;28(3):206-19. Epub 2015/04/19. doi: 10.1097/wco.000000000000205. PubMed PMID: 25887768.
62. Romanelli E, Merkler D, Mezydło A, Weil MT, Weber MS, Nikic I, et al. Myelinosome formation represents an early stage of oligodendrocyte damage in multiple sclerosis and its animal model. *Nat Commun*. 2016;7:13275. doi: 10.1038/ncomms13275. PubMed PMID: 27848954; PubMed Central PMCID: PMCPMC5116090.

Literaturverzeichnis

63. Caprariello AV, Stys PK. Turned Inside Out: Will Myelin-Protective Therapies Become the Next-Generation Anti-Inflammatories? *DNA and cell biology*. 2019;38(3):219-22. Epub 2018/11/22. doi: 10.1089/dna.2018.4496. PubMed PMID: 30461299.
64. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*. 2004;55(4):458-68. doi: 10.1002/ana.20016. PubMed PMID: 15048884.
65. Trapp BD. Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;605:29-43. Epub 1990/01/01. doi: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb42378.x. PubMed PMID: 1702602.
66. Lassmann H, Bartsch U, Montag D, Schachner M. Dying-back oligodendroglial pathology: a late sequel of myelin-associated glycoprotein deficiency. *Glia*. 1997;19(2):104-10. Epub 1997/02/01. PubMed PMID: 9034827.
67. Ludwin SK, Johnson ES. Evidence for a "dying-back" gliopathy in demyelinating disease. *Ann Neurol*. 1981;9(3):301-5. Epub 1981/03/01. doi: 10.1002/ana.410090316. PubMed PMID: 7224593.
68. Rodriguez M, Scheithauer B. Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastructural pathology*. 1994;18(1-2):3-13. Epub 1994/01/01. doi: 10.3109/01913129409016267. PubMed PMID: 8191643.
69. Rodriguez M, Scheithauer BW, Forbes G, Kelly PJ. Oligodendrocyte injury is an early event in lesions of multiple sclerosis. *Mayo Clinic proceedings*. 1993;68(7):627-36. Epub 1993/07/01. doi: 10.1016/s0025-6196(12)60597-7. PubMed PMID: 8350635.
70. Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Stefferl A, Bruck W, et al. Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003;62(1):25-33. Epub 2003/01/17. doi: 10.1093/jnen/62.1.25. PubMed PMID: 12528815.
71. Moscarello MA, Mastronardi FG, Wood DD. The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem Res*. 2007;32(2):251-6. Epub 2006/10/13. doi: 10.1007/s11064-006-9144-5. PubMed PMID: 17031564; PubMed Central PMCID: PMC1794624.
72. Kanter JL, Narayana S, Ho PP, Catz I, Warren KG, Sobel RA, et al. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nature medicine*. 2006;12(1):138-43. Epub 2005/12/13. doi: 10.1038/nm1344. PubMed PMID: 16341241.
73. Scheld M, Ruther BJ, Grosse-Veldmann R, Ohl K, Tenbrock K, Dreytmüller D, et al. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci*. 2016;36(4):1410-5. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016. PubMed PMID: 26818526.
74. Mana P, Fordham SA, Staykova MA, Correcha M, Silva D, Willenborg DO, et al. Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation. *Journal of neuroimmunology*. 2009;210(1-2):13-21. Epub 2009/04/07. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.013. PubMed PMID: 19344958.
75. Caprariello AV, Rogers JA, Morgan ML, Hoghooghi V, Plemel JR, Koebel A, et al. Biochemically altered myelin triggers autoimmune demyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(21):5528-33. Epub 2018/05/08. doi: 10.1073/pnas.1721115115. PubMed PMID: 29728463; PubMed Central PMCID: PMC6003499.
76. Boraschi D, Del Giudice G, Dutel C, Ivanoff B, Rappuoli R, Grubeck-Loebenstien B. Ageing and immunity: addressing immune senescence to ensure healthy ageing. *Vaccine*. 2010;28(21):3627-31. Epub 2010/04/07. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.035. PubMed PMID: 20362616.
77. Confavreux C, Vukusic S. Accumulation of irreversible disability in multiple sclerosis: from epidemiology to treatment. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2006;108(3):327-32. Epub 2006/01/18. doi: 10.1016/j.clineuro.2005.11.018. PubMed PMID: 16413961.

Literaturverzeichnis

78. Cortese M, Riise T, Bjornevik K, Bhan A, Farbu E, Grytten N, et al. Preclinical disease activity in multiple sclerosis: A prospective study of cognitive performance prior to first symptom. *Ann Neurol*. 2016;80(4):616-24. Epub 2016/08/25. doi: 10.1002/ana.24769. PubMed PMID: 27554176.
79. Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2009;8(3):280-91. Epub 2009/02/24. doi: 10.1016/s1474-4422(09)70043-2. PubMed PMID: 19233038.
80. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? Annual review of neuroscience. 2008;31:247-69. Epub 2008/06/19. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313. PubMed PMID: 18558855.
81. Irvine KA, Blakemore WF. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain*. 2008;131(Pt 6):1464-77. Epub 2008/05/21. doi: 10.1093/brain/awn080. PubMed PMID: 18490361.
82. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology*. 2006;59(3):478-89. doi: 10.1002/ana.20736.
83. Scheld M, Fragoulis A, Nyamoya S, Zendedel A, Denecke B, Krauspe B, et al. Mitochondrial Impairment in Oligodendroglial Cells Induces Cytokine Expression and Signaling. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2019;67(2):265-75. doi: 10.1007/s12031-018-1236-6.
84. Zeis T, Probst A, Steck AJ, Stadelmann C, Bruck W, Schaeren-Wiemers N. Molecular changes in white matter adjacent to an active demyelinating lesion in early multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2009;19(3):459-66. Epub 2008/11/20. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00231.x. PubMed PMID: 19016740.
85. De Groot CJ, Bergers E, Kamphorst W, Ravid R, Polman CH, Barkhof F, et al. Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions: increased yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. *Brain*. 2001;124(Pt 8):1635-45. Epub 2001/07/19. doi: 10.1093/brain/124.8.1635. PubMed PMID: 11459754.
86. Fischbach F, Nedelcu J, Leopold P, Zhan J, Clarner T, Nellessen L, et al. Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3. *Glia*. 2019;67(2):263-76. Epub 2018/12/05. doi: 10.1002/glia.23538. PubMed PMID: 30511355.
87. Teske N, Liessem A, Fischbach F, Clarner T, Beyer C, Wruck C, et al. Chemical hypoxia-induced integrated stress response activation in oligodendrocytes is mediated by the transcription factor nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2). *Journal of neurochemistry*. 2018;144(3):285-301. Epub 2017/12/07. doi: 10.1111/jnc.14270. PubMed PMID: 29210072.
88. Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2013;238(5):450-60. Epub 2013/07/17. doi: 10.1177/1535370213493069. PubMed PMID: 23856898.
89. Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2008;131(7):1722-35. doi: 10.1093/brain/awn105.
90. Adiele RC, Adiele CA. Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitochondrion*. 2019;44:7-14. Epub 2017/12/17. doi: 10.1016/j.mito.2017.12.005. PubMed PMID: 29246870.
91. di Penta A, Moreno B, Reix S, Fernandez-Diez B, Villanueva M, Errea O, et al. Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS one*. 2013;8(2):e54722. Epub 2013/02/23. doi: 10.1371/journal.pone.0054722. PubMed PMID: 23431360; PubMed Central PMCID: PMC3576396.
92. Rosenzweig S, Carmichael ST. Age-dependent exacerbation of white matter stroke outcomes: a role for oxidative damage and inflammatory mediators. *Stroke*. 2013;44(9):2579-86. Epub 2013/07/23. doi: 10.1161/strokeaha.113.001796. PubMed PMID: 23868277; PubMed Central PMCID: PMC3791618.

Literaturverzeichnis

93. Montgomery S, Hiyoshi A, Burkill S, Alfredsson L, Bahmanyar S, Olsson T. Concussion in adolescence and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017;82(4):554-61. Epub 2017/09/05. doi: 10.1002/ana.25036. PubMed PMID: 28869671.
94. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol*. 2009;118(6):723-36. doi: 10.1007/s00401-009-0591-3. PubMed PMID: 19763593.
95. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2014;47:485-505. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.004>.
96. Acs P, Selak MA, Komoly S, Kalman B. Distribution of oligodendrocyte loss and mitochondrial toxicity in the cuprizone-induced experimental demyelination model. *Journal of neuroimmunology*. 2013;262(1-2):128-31. Epub 2013/07/31. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.06.012. PubMed PMID: 23890807.
97. Varga E, Pandur E, Abrahám H, Horváth A, Ács P, Komoly S, et al. Cuprizone Administration Alters the Iron Metabolism in the Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Cellular and molecular neurobiology*. 2018;38(5):1081-97. doi: 10.1007/s10571-018-0578-5.
98. Goldberg J, Daniel M, van Heuvel Y, Victor M, Beyer C, Clarner T, et al. Short-term cuprizone feeding induces selective amino acid deprivation with concomitant activation of an integrated stress response in oligodendrocytes. *Cellular and molecular neurobiology*. 2013;33(8):1087-98. Epub 2013/08/28. doi: 10.1007/s10571-013-9975-y. PubMed PMID: 23979168.
99. Ruther BJ, Scheld M, Dreytmueller D, Clarner T, Kress E, Brandenburg LO, et al. Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. *Glia*. 2017. Epub 2017/08/25. doi: 10.1002/glia.23202. PubMed PMID: 28836302.
100. Limmroth V. Wie viele MS-Patienten gibt es eigentlich in Deutschland? *InFo Neurologie & Psychiatrie*. 2018;20(2):3-. doi: 10.1007/s15005-018-2489-x.
101. Sidman RL, Angevine JB, Pierce ET. *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*: Harvard University Press; 1971 01.01.1971. 272 p.
102. Sepehrband F, Alexander DC, Kurniawan ND, Reutens DC, Yang Z. Towards higher sensitivity and stability of axon diameter estimation with diffusion-weighted MRI. *NMR in biomedicine*. 2016;29(3):293-308. Epub 2016/01/11. doi: 10.1002/nbm.3462. PubMed PMID: 26748471; PubMed Central PMCID: PMC4949708.
103. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *European journal of pharmacology*. 2015;759:182-91. Epub 2015/04/01. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.042. PubMed PMID: 25823807.
104. Bhat RV, Axt KJ, Fosnaugh JS, Smith KJ, Johnson KA, Hill DE, et al. Expression of the APC tumor suppressor protein in oligodendroglia. *Glia*. 1996;17(2):169-74. Epub 1996/06/01. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199606)17:2<169::Aid-glia8>3.0.Co;2-y. PubMed PMID: 8776583.
105. Chrzanowski U, Bhattarai S, Scheld M, Clarner T, Fallier-Becker P, Beyer C, et al. Oligodendrocyte degeneration and concomitant microglia activation directs peripheral immune cells into the forebrain. *Neurochemistry International*. 2019;126:139-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.005>.
106. Mangiardi M, Crawford DK, Xia X, Du S, Simon-Freeman R, Voskuhl RR, et al. An animal model of cortical and callosal pathology in multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2011;21(3):263-78. Epub 2010/10/30. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00444.x. PubMed PMID: 21029240; PubMed Central PMCID: PMC45233755.
107. Reeves TM, Phillips LL, Povlishock JT. Myelinated and unmyelinated axons of the corpus callosum differ in vulnerability and functional recovery following traumatic brain injury. *Experimental neurology*. 2005;196(1):126-37. Epub 2005/08/20. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.07.014. PubMed PMID: 16109409.

Literaturverzeichnis

108. Fernandez-Gamba A, Leal MC, Maarouf CL, Richter-Landsberg C, Wu T, Morelli L, et al. Collapsin response mediator protein-2 phosphorylation promotes the reversible retraction of oligodendrocyte processes in response to non-lethal oxidative stress. *Journal of neurochemistry*. 2012;121(6):985-95. Epub 2012/03/27. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07742.x. PubMed PMID: 22443207; PubMed Central PMCID: PMC3371108.
109. Cui QL, Khan D, Rone M, V TSR, Johnson RM, Lin YH, et al. Sublethal oligodendrocyte injury: A reversible condition in multiple sclerosis? *Ann Neurol*. 2017;81(6):811-24. Epub 2017/05/05. doi: 10.1002/ana.24944. PubMed PMID: 28470695.
110. Benetti F, Ventura M, Salmini B, Ceola S, Carbonera D, Mammi S, et al. Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. *Neurotoxicology*. 2010;31(5):509-17. Epub 2010/08/06. doi: 10.1016/j.neuro.2010.05.008. PubMed PMID: 20685220.
111. Li Z, Zhang Y, Li D, Feng Y. Destabilization and mislocalization of myelin basic protein mRNAs in quaking dysmyelination lacking the QKI RNA-binding proteins. *J Neurosci*. 2000;20(13):4944-53. Epub 2000/06/24. PubMed PMID: 10864952; PubMed Central PMCID: PMC6772302.
112. Bin JM, Harris SN, Kennedy TE. The oligodendrocyte-specific antibody 'CC1' binds Quaking 7. *Journal of neurochemistry*. 2016;139(2):181-6. Epub 2016/07/28. doi: 10.1111/jnc.13745. PubMed PMID: 27454326.
113. Hardy RJ, Loushin CL, Friedrich VL, Jr., Chen Q, Ebersole TA, Lazzarini RA, et al. Neural cell type-specific expression of QKI proteins is altered in quakingviable mutant mice. *J Neurosci*. 1996;16(24):7941-9. Epub 1996/12/15. PubMed PMID: 8987822; PubMed Central PMCID: PMC6579212.
114. Erwig MS, Patzig J, Steyer AM, Dibaj P, Heilmann M, Heilmann I, et al. Anillin facilitates septin assembly to prevent pathological unfoldings of central nervous system myelin. *eLife*. 2019;8. Epub 2019/01/24. doi: 10.7554/eLife.43888. PubMed PMID: 30672734; PubMed Central PMCID: PMC6344079.
115. Patzig J, Erwig MS, Tenzer S, Kusch K, Dibaj P, Möbius W, et al. Septin/anillin filaments scaffold central nervous system myelin to accelerate nerve conduction. *eLife*. 2016;5:e17119. doi: 10.7554/eLife.17119.
116. Solomon IH, Chettimada S, Misra V, Lorenz DR, Gorelick RJ, Gelman BB, et al. White Matter Abnormalities Linked to Interferon, Stress Response, and Energy Metabolism Gene Expression Changes in Older HIV-Positive Patients on Antiretroviral Therapy. *Molecular neurobiology*. 2019. Epub 2019/11/07. doi: 10.1007/s12035-019-01795-3. PubMed PMID: 31691183.
117. Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *Journal of neurochemistry*. 2007;100(6):1431-48. Epub 2007/01/24. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x. PubMed PMID: 17241126.
118. Deluca GC. Axonal loss in multiple sclerosis: a pathological survey of the corticospinal and sensory tracts. *Brain*. 2004;127(5):1009-18. doi: 10.1093/brain/awh118.
119. Butt AM, Ibrahim M, Berry M. Axon-myelin sheath relations of oligodendrocyte unit phenotypes in the adult rat anterior medullary velum. *Journal of Neurocytology*. 1998;27(4):205-17. doi: 10.1023/a:1006984915230.
120. Pfeiffer F, Frommer-Kaestle G, Fallier-Becker P. Structural adaptation of axons during de- and remyelination in the Cuprizone mouse model. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2019;29(5):675-92. Epub 2019/05/21. doi: 10.1111/bpa.12748. PubMed PMID: 31106489.
121. Crawford DK, Mangiardi M, Xia X, López-Valdés HE, Tiwari-Woodruff SK. Functional recovery of callosal axons following demyelination: a critical window. *Neuroscience*. 2009;164(4):1407-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.069>.
122. Crawford DK, Mangiardi M, Tiwari-Woodruff SK. Assaying the functional effects of demyelination and remyelination: revisiting field potential recordings. *Journal of neuroscience methods*. 2009;182(1):25-33. Epub 2009/06/02. doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.05.013. PubMed PMID: 19481113.

Literaturverzeichnis

123. Halliday AM, McDonald WI, Mushin J. Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet (London, England)*. 1972;1(7758):982-5. Epub 1972/05/06. doi: 10.1016/s0140-6736(72)91155-5. PubMed PMID: 4112367.
124. Armstrong RC, Le TQ, Flint NC, Vana AC, Zhou YX. Endogenous cell repair of chronic demyelination. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2006;65(3):245-56. Epub 2006/05/03. doi: 10.1097/01.jnen.0000205142.08716.7e. PubMed PMID: 16651886; PubMed Central PMCID: PMCPMC1635791.
125. Joost S, Kobayashi K, Wree A, Haas SJ. Optimisation of murine organotypic slice culture preparation for a novel sagittal-frontal co-culture system. *Journal of neuroscience methods*. 2017;285:49-57. Epub 2017/05/10. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.05.003. PubMed PMID: 28478074.
126. Osanai Y, Shimizu T, Mori T, Yoshimura Y, Hatanaka N, Nambu A, et al. Rabies virus-mediated oligodendrocyte labeling reveals a single oligodendrocyte myelinates axons from distinct brain regions. *Glia*. 2017;65(1):93-105. Epub 2016/10/21. doi: 10.1002/glia.23076. PubMed PMID: 27759175.
127. Rumsby M, Afsari F, Stark M, Hughson E. Microfilament and microtubule organization and dynamics in process extension by central glia-4 oligodendrocytes: evidence for a microtubule organizing center. *Glia*. 2003;42(2):118-29. Epub 2003/03/26. doi: 10.1002/glia.10211. PubMed PMID: 12655596.
128. Hendriks JJ, Alblas J, van der Pol SM, van Tol EA, Dijkstra CD, de Vries HE. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(12):1667-72. Epub 2004/12/22. doi: 10.1084/jem.20040819. PubMed PMID: 15611292; PubMed Central PMCID: PMCPMC2212002.
129. Schreibelt G, van Horssen J, van Rossum S, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain research reviews*. 2007;56(2):322-30. Epub 2007/09/01. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.07.005. PubMed PMID: 17761296.

VI. Publikationsliste

Originalarbeiten

Joost S, **Schweiger F**, Pfeiffer F, Ertl C, Keiler J, Frank M, et al. Cuprizone Intoxication Results in Myelin Vacuole Formation. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2022;16. doi: 10.3389/fncel.2022.709596.

Lemke D, Klement RJ, **Schweiger F**, Schweiger B, Spitz J. Vitamin D Resistance as a Possible Cause of Autoimmune Diseases: A Hypothesis Confirmed by a Therapeutic High-Dose Vitamin D Protocol. *Front Immunol*. 2021 Apr 7;12:655739. doi: 10.3389/fimmu.2021.655739. PMID: 33897704; PMCID: PMC8058406.

Kunisch R, Zimmermann P, Berges N, Nitzschke M, **Schweiger F**, Seidl M, Weidenbusch M. Learning in peer teaching of patient relations and communication skills at the "Anamnesegruppen" Munich - proof-of-concept and lessons learned. *GMS J Med Educ*. 2021 Jan 28;38(1):Doc4. doi: 10.3205/zma001400. PMID: 33659609; PMCID: PMC7899106.

Yakimov V, **Schweiger F**, Zhan J, Behrangi N, Horn A, Schmitz C, Hochstrasser T, Kipp M. Continuous cuprizone intoxication allows active experimental autoimmune encephalomyelitis induction in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol*. 2019 Aug;152(2):119-131. doi: 10.1007/s00418-019-01786-4. Epub 2019 Apr 23. PMID: 31016368.

Chrzanowski U, Bhattarai S, Scheld M, Clarner T, Fallier-Becker P, Beyer C, Rohr SO, Schmitz C, Hochstrasser T, **Schweiger F**, Amor S, Horn-Bochtler A, Denecke B, Nyamoya S, Kipp M. Oligodendrocyte degeneration and concomitant microglia activation directs peripheral immune cells into the forebrain. *Neurochem Int*. 2019 Jun;126:139-153. doi: 10.1016/j.neuint.2019.03.005. Epub 2019 Mar 10. PMID: 30867127.

Reviews

Nyamoya S, **Schweiger F**, Kipp M, Hochstrasser T. Cuprizone as a model of myelin and axonal damage. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2017;25:63-68. doi: 10.1016/j.ddmod.2018.09.003. ISSN: 1740-6757.

Posterpräsentationen

Schweiger F, Fischbach F, Nedelcu J, Pfeiffer F, Chrzanowski U, Fallier-Becker P, Kipp M. Compact Myelin Detachment after metabolic Oligodendrocyte injury. 25th annual meeting of the European Charcot Foundation; Dezember 2017; Baveno, Italien.

Nedelcu J, **Schweiger F**, Fischbach F, Kipp M. Segmental demyelination of internodes triggers mitochondrial distribution. 25th annual meeting of the European Charcot Foundation; Dezember 2017; Baveno, Italien.

VII. Affidavit

Eidesstattliche Versicherung

Schweiger, Felix Martin Anton

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „**Ultrastrukturelle und funktionelle Pathologien bei metabolischer Oligodendroglipathie: Relevanz für die Multiple Sklerose**“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, den 03.02.2023

Felix Schweiger

VIII. Danksagung

Diese Zeilen möchte ich nutzen, um herzlichst Danke zu sagen!

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp, für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, Unterstützung, Motivation und lehrreiche Zeit. Danke!

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz danke ich für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren und dabei von allen Mitarbeitern unterstützt zu werden.

Frau Dr. Tanja Hochstrasser danke ich für die gute Betreuung, Erreichbarkeit und Hilfe bei der Durchführung neuer Versuche.

Frau PD Dr. rer. nat. Petra Fallier-Becker, Frau Dr. Friederike Pfeiffer, Herrn Prof. Dr. med. Jens Waschke und Herrn Dr. med. dent. Elias Walter danke ich herzlich für die gute Kooperation und Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche.

Ein spezieller Dank geht an Sarah Wübbel, Astrid Baltruschat, Beate Aschauer und Sabine Tost, die mich alle mit ihrer so hilfreichen technischen Assistenz immens unterstützt haben.

Meiner Familie, meinen Freunden und Lena danke ich für die stete Förderung und Unterstützung während der Promotion, im Studium und darüber hinaus. Danke, dass ich meine Begeisterung mit Euch teilen darf und ich in Euch stete Ansprechpartner habe.

IX. Lebenslauf